

ANDRÉ TWARDOWSCHY

**Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito
gastroprotetor das cascas de
Tabebuia avellanedae Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Consuelo
Andrade Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Michel F. Otuki

Curitiba

2007

AGRADECIMENTOS

À profª. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques, por todo o conhecimento e atenção dispensados durante todo esse período e por me aceitar como seu orientado sem me conhecer, e depois de descobrir minhas teimosias ter a paciência de continuar me orientando.

Aos professores do departamento de farmacologia que sempre se dispuseram a me ensinar, em especial ao prof. Dr. Michel Otuki que foi decisivo na reta final do meu trabalho.

Ao prof. Dr. Moacir Pizolatti, pelo apoio fitoquímico e fornecimento dos extratos.

Aos funcionários do biotério Cândido, Luis e Júlio que estavam dispostos a ajudar e forneciam os animais sempre que eu precisava, mesmo aqueles de última hora.

Às minhas mestras, Cris S. e Cris B., que além da ajuda nos experimentos e ensinamentos, me deram algo mais importante, “me deram a vara pra pescar” e fizeram com que eu fosse capaz de realizar esse trabalho.

À toda a galera da farmaco e do futebol, que estavam sempre tentando me levar pro “mau caminho”, mas consegui resistir. Novos amigos que fizeram com que todo esse período fosse muito mais agradável.

À eterna galera “farmaco people”, Cris S., Bárbara, Cris B., Fran e Ana que foram essenciais em todos os sentidos, desde o trabalho duro no lab. 81 até as viagens pra Guarda, Morretes, Ilha do Mel, Floripa, Ribeirão Preto e na organização das melhores festas que a farmaco já teve, que com certeza vão ficar na memória.

A todos da minha família que me apoiaram nessa minha jornada.

E principalmente aos meus pais, José Carlos e Neide, que apesar de não entenderem direito o que eu fazia, sempre me incentivaram e confiaram em mim. E por continuarem dando todo apoio que preciso.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.....	3
1.1.1 Morfologia e Ocorrência Natural.....	4
1.1.2 Constituintes Químicos.....	5
1.1.3 Atividades Biológicas.....	6
1.1.3.1 Atividade Antiúlcera.....	8
1.2 Revisão Bibliográfica da Úlcera Gástrica.....	8
1.2.1 Etiologia.....	8
1.2.2 Fatores Agressores Etiologia.....	9
1.2.2.1 <i>Helicobacter Pylori</i>	10
1.2.3 Fatores Protetores.....	11
1.2.4 Secreção Ácida Gástrica.....	17
1.2.4.1 Mecanismos Centrais.....	18
1.2.4.2 Mecanismos Periféricos.....	18
1.2.4.2 a) Estimulantes.....	18
1.2.4.2 b) Inibidores.....	20
1.2.4.3 Mecanismo Intracelular.....	21
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivos Gerais.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Material Botânico.....	23
3.1.1.1 Obtenção do Extrato.....	23
3.1.2 Animais.....	24
3.1.3 Drogas, Reagentes, Solventes e Sais.....	25
3.1.4 Equipamentos.....	25
3.2 Metodologia.....	26
3.2.1 Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da <i>T. avellanedae</i> em modelo de úlcera aguda	26
3.2.1.1 Lesões gástricas induzidas por etanol	26
3.2.1.2 Quantificação do muco gástrico.....	26
3.2.1.3 Lesões gástricas induzidas por ibuprofeno.....	27
3.2.2 Avaliação da atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera crônica.....	27
3.2.2.1 Lesões gástricas induzidas por ácido acético	27
3.2.2.2 Atividade da MPO.....	28
3.2.3 Estudo <i>in vitro</i> da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH).....	28
3.2.4 Avaliação da atividade antissecretora ácida.....	29
3.2.4.1 Ligadura de Píloro em ratos	29
3.2.4.2 Ligadura de Píloro em ratos estimulados com os secretagogos betanecol, pentagastrina e histamina.....	29
3.2.4.3 Ensaio da Atividade Enzimática da H ⁺ , K ⁺ - ATPase.....	30

3.2.5 Avaliação da Motilidade Gastrintestinal.....	31
3.2.5.1 Esvaziamento Gástrico de Semi-sólidos.....	31
3.2.5.2 Trânsito Intestinal.....	31
3.2.6 Expressão dos dados e análise estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Avaliação da atividade protetora gástrica do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo (EHI) em ratos.....	33
4.1.1 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo (EHI) sobre as lesões gástricas induzidas agudamente por etanol em ratos.....	33
4.1.2 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo via oral sobre a quantidade de Muco Gástrico após a indução de lesões por etanol em ratos.....	34
4.1.3 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo (EHI) via intraperitoneal sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratos.....	34
4.1.4 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo via intraperitoneal sobre a quantidade de Muco Gástrico após a indução de lesões por etanol em ratos...	35
4.1.5 Lesões gástricas induzidas por ibuprofeno em ratos.....	36
4.1.6 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo (EHI) sobre a cicatrização da lesão gástrica crônica em ratos.....	37
4.1.7 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) após a indução de úlcera crônica em ratos.....	38
4.2 Ação seqüestradora de radicais livres do EHI e suas frações sobre o seqüestro do radical DPPH	39
4.3 Efeitos anti-secretor do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo (EHI)	40
4.3.1 Efeitos do EHI sobre a secreção ácida gástrica basal em ratos.....	40
4.3.2 Efeitos do EHI sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratos.....	41

4.3.3 Efeito do EHI sobre a atividade da bomba H ⁺ /K ⁺ /ATPase in vitro	44
4.4 Avaliação da Motilidade Gastrintestinal.....	45
4.4.1 Efeito do EHI sobre o Trânsito intestinal em camundongos.....	45
4.4.2 Efeitos do EHI sobre o Esvaziamento gástrico de semi-sólidos em camundongos.....	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

A úlcera péptica é causada por um desequilíbrio entre os mecanismos protetores e agressores da mucosa, e é resultado da associação de diversos fatores agressores endógenos (ácido, pepsina e bile) e fatores exógenos relacionados as condições de vida (estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias não esteroidais e a infecção pelo *Helicobacter pylori*).

O uso do ipê-roxo para o tratamento de úlceras pépticas é realizado de forma indiscriminada, sem base em estudos científicos que tenham validado a sua ação. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a eficácia como gastroprotetor do extrato bruto hidroalcoólico das cascas da *Tabebuia avellanae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae) e esclarecer as vias envolvidas nesse efeito.

Os resultados do estudo mostraram que o extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI) v.o. foi efetivo e protegeu a mucosa gástrica contra úlceras agudas induzidas pelo etanol 80% e ibuprofeno. A administração via i.p. do EHI protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol e aumentou o muco gástrico. O tratamento crônico com EHI em ratos com úlcera pré-formadas, pela injeção de ácido acético na sub-serosa gástrica, acelerou a cicatrização da úlcera. Tanto o EHI como suas frações demonstraram atividade sequestradora do radical livre DPPH *in vitro*. No modelo da ligadura do piloro de ratas o EHI diminuiu a acidez e o volume da secreção gástrica basal e impediu o aumento da acidez e volume da secreção gástrica estimulada por histamina e pentagastrina. O EHI inibiu a atividade da bomba de prótons *in vitro*.

Esses resultados em conjunto, comprovam a utilização popular das cascas do ipê-roxo como gastroprotetor, e fornecem embasamento para a continuidade das pesquisas com a *T. avellanae* para ampliação do entendimento dos mecanismos de ação e compostos responsáveis por esses efeitos.

Palavras-chave: *Tabebuia avellanae*, efeito gastroprotetor, úlceras gástrica, secreção ácida gástrica.

ABSTRACT

The peptic ulcer is caused by an unbalance between the protective and aggressive mechanisms of the mucosa, and is resulted of the association of several endogenous aggressive factors (as acid and pepsin) and exogenous factors related to the life conditions (as stress, tobacco, alcohol, continuous use of non-steroid anti-inflammatory drugs and infection by *Helicobacter pylori*).

The use of the “ipê-roxo” for the treatment of peptic ulcers it's made of indiscriminate form, without base in scientific studies that have validated its action. The aim of this work is verify the gastroprotective effects of hydroalcoholic bark extract of *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb and clarify the pathways involved in this effect.

The results of this study showed that the hydroalcoholic extract of “ipê-roxo” (EHI) p.o. administration was effective and protected the gastric mucosa against ethanol and ibuprofen gastric ulcer induced. The EHI administration i.p. protected the gastric mucous against the ethanol-induced ulcer and enhanced the gastric mucus production. In rats with pre-formed ulcer, induced by injection of acid acetic in gastric subserosa, the chronic treatment with EHI improved the ulcer cicatrisation. EHI and it's fractions were able to sequester the DPPH free radical. In pylorus ligation model, the total acidity and gastric volume was reduced in rats treated with EHI. In the same model, the pre-treatment with EHI inhibited the increase of acidity and gastric volume stimulated by histamine and pentagastrin. EHI inhibited the proton pump *in vitro* model.

These results confirmed the EHI action reported in folk medicine and showed the potential for new studies with EHI to clarify its mechanism of action.

Key-words: *Tabebuia avellanedae*, gastric ulcers, acid gastric secretion.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina popular brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo mostram que tais produtos podem causar efeitos nocivos e provam que o mito “O que é natural não faz mal” é uma verdade insustentável.

As plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente a base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população.

Cerca da metade (49%) das novas moléculas introduzidas entre 1981 e 2002 são produtos naturais, análogos semi-sintéticos de produtos naturais ou compostos sintéticos baseados em grupos farmacofóricos de produtos naturais (NEWMAN et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 65-80% da população de países em desenvolvimento, devido à pobreza ou ao difícil acesso a medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os primeiros cuidados da saúde. Entretanto, poucas plantas (menos de 10%) têm estudos científicos para validação de sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

A venda de produtos derivados de plantas no mundo está em torno dos 100 bilhões de dólares por ano (GILANI, 2005). A América Latina possui grande parte da biodiversidade mundial, e o Brasil sozinho possui em torno de 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes. Entretanto, é estimado que não mais do que 25.000 espécies de plantas no mundo tem sido objeto de algum tipo de investigação científica (CALIXTO, 2005).

Apesar de o Brasil possuir a mais rica biodiversidade do mundo e da existência no país de um grande número de grupos de pesquisa, que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, da quimiotaxonomia, da farmacologia de produtos naturais e de outras áreas relacionadas, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et. al., 2001).

Em contraste a muitos milhões de dólares e vários anos de pesquisa necessários para o desenvolvimento de novas drogas sintéticas, ou até mesmo de um protótipo de fonte natural, o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados demanda consideravelmente menos dinheiro e mostra ser perfeitamente possível em países em desenvolvimento (CALIXTO, 2000).

Atropina, ácido salicílico, artemisinina, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, fisostigmina, pilocarpina, quinina, reserpina, taxol, tubocurarina, vincristina e vinblastina são alguns exemplos de fármacos derivados de plantas medicinais. A maioria dessas drogas derivadas de plantas foram descobertas através da investigação das curas tradicionais e conhecimentos populares (GILANI, 2005).

O Estado do Paraná, além de ser o maior produtor de Plantas medicinais do País, também tem um número elevado de pesquisadores envolvidos com os seus estudos. A maioria das pesquisas aborda as atividades biológicas (34%). Dentre essas atividades biológicas estudadas, 60% são na área de Farmacologia. Entre os vários estudos farmacológicos realizados, em torno de 17%, tratam dos efeitos das plantas medicinais sobre o trato gastrointestinal (GUIMARÃES et al., 2004).

De fato, produtos destinados para o tratamento de problemas gástricos são muito procurados na prática de auto-medicação. Neste sentido a utilização popular

do ipê-roxo para o tratamento de úlceras pépticas é comum e feito de forma indiscriminada sem base em estudos científicos que tenham validado a sua ação. Além disto, a comercialização de vários produtos contendo o ipê-roxo, ou a sua casca e/ ou o seu cerne é realizada por várias empresas em nosso estado. Com isto, o ipê-roxo apresenta destaque com grande importância sócio/econômica, precisando, de estudos científicos que validem sua utilização através da demonstração da sua eficácia e segurança.

1.1 *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb

Neste trabalho foi utilizado como material de estudo as cascas da *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb. (figura 1), uma árvore da família Bignoniaceae. O gênero da *Tabebuia* inclui cerca de 100 espécies que são encontradas principalmente na América do Sul. O nome comum *ipê* (bem como outros nomes como *pau d'arco* e *lapacho*) é usado para muitas espécies diferentes de árvores de *Tabebuia* que são intercambiáveis em seu uso medicinal. Mesmo sem comprovações científicas, sua casca é utilizada popularmente como analgésico, antiinflamatório, antineoplásico e diurético (MIRANDA et al., 2001).

Tabebuia avellanedae Lorentz ex Griseb é conhecida por suas flores roxas, frequentemente chamada de ipê-roxo, e tem sido dentro de seu gênero a espécie preferencialmente utilizada. O ipê-roxo pode ser referido por outros nomes botânicos: *Gelsemium avellanedae* (Lorentz ex Griseb.), *Tecoma avellanedae* (Lorentz ex Griseb.) (The International Plant Names Index 2004). Outras espécies de ipê produzem flores rosa (*T. heptaphylla* e *T. impetiginosa*), amarelas (*T. serratifolia* e *T. chrysantha*) ou brancas (*T. bahamensis*).

a)



b)



c)



d)



Figura 1: Árvore adulta da *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (a) e em detalhe os frutos (b), flores (c) e folhas (d).

(Fonte: <http://arvoresdeirati.com/index.php?area=descricao&id=196>)

1.1.1 Morfologia e Ocorrência Natural

Árvore de até 30 m de altura, podendo atingir 90 cm de diâmetro. O tronco, mais ou menos reto e cilíndrico, possui casca pouco espessa e escura, fissurada longitudinalmente e descorticante em placas grandes. A casca apresenta coloração pardo-cinzenta.

As folhas, de coloração verde-escura, são opostas, decíduas, compostas, digitadas, longamente pecioladas e com os bordos serrilhados. Cada folha é composta por 5 a 7 folíolos, glabros, com ápice agudo.

A flor, roxo-violácea, é pouco pilosa. São muito abundantes, nascendo nos ramos ainda sem folhas, com lenho adulto.

Ocorre naturalmente no sul e oeste da Bahia, no Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo e no nordeste da Argentina, sul da Bolívia, leste do Paraguai e Uruguai (CARVALHO, 1994).

1.1.2 Constituintes Químicos da *Tabebuia avellanedae*

Os principais compostos isolados nessa espécie foram o lapachol (figura 3 I), naftoquinonas (figura 2 b e c) e antraquinonas (figura 2 a). Contém ainda lapachenol, quercetina, ácido *orto* - e *para*-hidroxibenzóico (FONSECA 2003). No gênero da *Tabebuia* estão presente os compostos filoquinona (vitamina K) e manadiona (vitamina K3), além de várias quinonas, benzenóides e flavonóides (TAYLOR, 2005). As substâncias mais estudadas nesta espécie são: o lapachol, os dois isômeros, α -lapachona e β -lapachona, e a xiloidona (desidro- α -lapachona), todos biologicamente ativos (FONSECA 2003).

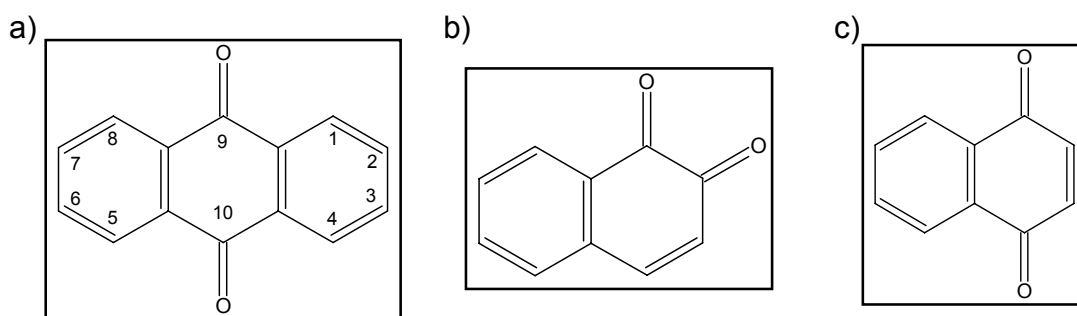


Figura 2: a)9,10-antraquinona, b)1,2-naftoquinona e c)1,4-naftoquinona

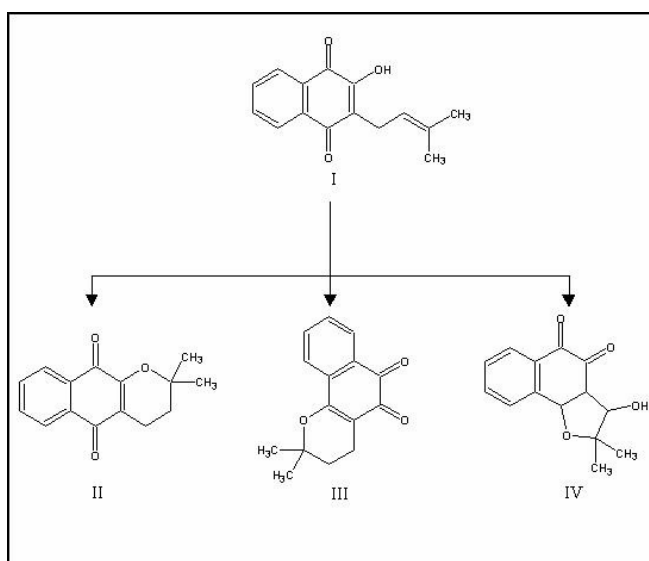


Figura 3: I) Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)napftoquinona);
 II) α-lapachona (2,2-dimetil-2H-benzo cromeno-5,10-diona);
 III) β-lapachona (2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo coromeno-5,6-dione);
 IV) 3-hidroxi-β-n-lapachona

1.1.3 Atividades Biológicas

O ipê tem uma longa história como planta medicinal no mundo. Dentre as atividades/propriedades descritas estão a ação adstringente, a sua utilização para o tratamento de úlceras pépticas, para infecções do trato urinário, diabetes, alergias, reumatismo e artrites. No entanto, são propriedades atribuídas sem a comprovação através de estudos científicos. Existem alguns estudos com o extrato do ipê-roxo ou com seus constituintes químicos que analisaram sua ação antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica além de estudos com células tumorais (TAYLOR, 2005).

Son et al. 2006, demonstraram que o extrato metanólico do cerne de ipê-roxo é capaz de inibir a agregação plaquetária e a proliferação de células da musculatura lisa vascular, provavelmente através da redução da liberação de ácido araquidônico (AA) e ativação da ERK1/2 MAPK (Quinase 1/2 regulada por

sinal extracelular /Proteína Quinase regulada por Mitógeno). Nesse mesmo trabalho foi descrito que as frações acetato de etila, n-hexânica e clorofórmica do ipê-roxo apresentaram ação semelhante, especialmente a fração clorofórmica da *T. impetiginosa*. Segundo Son et al. 2006, esses resultados indicam que o ipê-roxo pode ser uma boa fonte para o desenvolvimento de agentes antitrombóticos, visando à inibição da cascata do AA.

Lee et al. 2005, demonstraram que a β -lapachona, presente na *T. avellanedae*, foi capaz de diminuir a expressão da proteína e RNAm da COX-2 de maneira dependente da concentração. Além disso, a β -lapachona também inibiu a produção de PGE2 em células DU145 (linhagem celular de carcinoma prostático humano). Os autores sugeriram baseados nesses resultados, que a inibição da produção de PGE2 e expressão de COX-2 confirmam os resultados que a β -lapachona inibe o crescimento e induz a apoptose nessa linhagem celular de carcinoma prostático (LEE et al., 2005).

O ipê-roxo possui amplo espectro de ação contra numerosas doenças causadas por microorganismos. Em muitos estudos ela apresentou forte atividade *in vitro* contra bactérias, fungos e leveduras, como por exemplo: *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Brucella* sp e *Helicobacter pylori* (TAYLOR, 2005). O extrato aquoso a quente da *T. avellanedae* mostrou ação contra *Staphylococcus aureus* e a *Helicobacter pylori*, bactéria essa envolvida na etiologia da úlcera péptica (TAYLOR, 2005). O extrato diclorometano da casca da *T. avellanedae* mostrou atividade de amplo espectro contra várias cepas de fungos. (PORTILLO et al., 2001). O extrato metanólico da casca de *T. avellanedae* exibiu potente atividade contra *H. pylori*. Os constituintes ativos foram identificados como sendo o 2-(hidroximetil) antraquinona, antraquinona-2-ácido carboxílico e lapachol (PARK et al., 2006). A ação antibacterina contra a *H. pylori*, torna essa planta uma fonte em potencial para o tratamento da úlcera péptica associada à infecção por *H. pylori*.

1.1.3.1 Atividade Anti-úlcera

Na úlcera induzida pelo modelo de estresse, a administração oral duas vezes ao dia de lapachol 5 mg/kg, durante 3 dias, promoveu uma redução de 56% do índice de úlceras. Neste mesmo trabalho, foi descrito que o lapachol não afetou nenhum parâmetro secretório exceto o conteúdo de proteínas do suco gástrico que foi reduzido significativamente (GOEL et al., 1987).

Recentemente Tariq & Al Moutaery 2005, descreveram a ação protetora gástrica da menadiona, composto presente na *Tabebuia avellanedae*. Os autores verificaram que a administração de menadiona via oral a ratos, reduziu a acidez gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro, e protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol.

Até o presente momento, não existem trabalhos que comprovam os relatos populares da ação gastroprotetora do extrato da *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA ÚLCERA GÁSTRICA

1.2.1 ETIOLOGIA

Úlcera péptica é uma doença comum do trato gastrointestinal e a sua patogênese é multifatorial, incluindo infecções pelo *Helicobacter pylori*, aumento da concentração de ácido gástrico, de pepsina, alterações na motilidade gastroduodenal, hábitos de vida como o tabagismo e ingestão de bebida alcoólica. Todas essas ações contribuem para o desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores do estômago (EASTWOOD, 1997).

Gastrite literalmente significa inflamação do estômago. Este termo pode se referir à gastrite aguda ou crônica, que na realidade são duas doenças muito diferentes (LIPOF et al., 2006). A dispepsia refere-se a um grupo de sintomas do trato gastrointestinal superior que ocorre comumente em adultos. A dispepsia é

conhecida por ser resultante de causas orgânicas, mas a maioria dos pacientes sofre da forma não ulcerosa ou dispepsia funcional (MAHADEVA & GOH 2006).

Gastrite aguda é em muitos casos sinônimo de gastrite erosiva. Essa pode ser devida a um dano tóxico a mucosa gástrica, comumente ocasionada por antiinflamatórios não esteroidais (AINE) ou ingestão de álcool (LIPOF et al., 2006).

A úlcera por estresse se desenvolve usualmente em poucas horas após queimadura, politraumas, lesão no sistema nervoso central, choque, grandes operações ou infecção severa (DEMBINSK et al., 2005).

O estresse pode facilitar a evolução da infecção pelo *H. pylori* pela produção aumentada de ácido gástrico, levando a úlcera péptica (LEE et al., 1995). Muitos pacientes podem desenvolver inflamação crônica porque a evolução da gastrite crônica induzida pela *H. pylori* é assintomática. Outro tipo de gastrite crônica é o refluxo duodenal, esses casos são caracterizados por dor abdominal e vômito com bÍlis (LIPOF et al., 2006)

1.2.2 Fatores Agressores

Uma variedade de fatores produz danos a mucosa gástrica, incluindo eventos sistêmicos como estresse térmico ou contato direto na mucosa com vários irritantes que são comumente chamados de desestabilizadores da barreira da mucosa gástrica. O desequilíbrio entre agentes gastrotóxicos e mecanismos protetores resultam em inflamação aguda (KWIECIEN et al. 2002 a).

Aproximadamente 20% dos usuários regulares de AINE desenvolvem uma úlcera de estômago ou duodeno. A importância das prostaglandinas (PG) na defesa da mucosa é evidenciada pela capacidade dos AINE induzirem danos na mucosa gástrica, dano esse correlacionado com sua habilidade em suprimir a síntese de PG gástricas. Agentes que são fracos inibidores da síntese de PG, incluindo inibidores seletivos de COX-2, são menos ulcerogênicos (WALLACE 2001 b).

O fluxo sangüíneo contribui para a proteção gástrica por fornecer a mucosa oxigênio, bicarbonato, substâncias nutritivas e por remover dióxido de carbono,

íons hidrogênio e difundir agentes tóxicos do lúmen gástrico. A hipóxia gástrica, resultante da acumulação de H^+ na mucosa gástrica, leva a acidificação do estômago e desenvolvimento de úlcera gástrica (SORBYE & SVANES, 1994).

As espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico, plaquetas, macrófagos e células musculares lisas também podem contribuir de forma significativa para o dano na mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY 2002).

O NO também pode contribuir para o dano celular em condições inflamatórias via reações de nitração, dessa forma, gerando peroxinitritos, os quais são responsáveis pela nitração de resíduos de tirosina nas proteínas, depleção de reserva energética nas mitocôndrias e causar quebras nas fitas de DNA (BECKMAN et al., 1996).

1.2.2.1 *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma das bactérias patogênicas mais amplamente distribuídas, podendo ser encontrada em aproximadamente metade da população mundial (ZEVERING et al., 1999) e está relacionada com algumas importantes doenças gastrintestinais como gastrite crônica (BLASER, 1990), úlcera péptica, linfoma - tecido linfóide associado à mucosa (MALT) (PARSONNET et al., 1994) e carcinoma gástrico (EL-OMAR et al., 2000).

A infecção pela *H. pylori* não pode ser considerada causa única de desenvolvimento de úlcera péptica, sendo que muitas pessoas são infectadas e não desenvolvem mas não desenvolvem úlcera gástrica. Existem evidências sólidas que indicam que o estresse fisiológico gera úlcera gástrica e prejudica a resposta ao tratamento, assim, o estresse fisiológico funciona como um co-fator com o *H. pylori* (LEVENSTEIN, 1998) para a formação da úlcera gástrica.

Os indivíduos que apresentam inflamação gástrica devido a presença da *H. pylori* aparentemente são mais resistentes ao dano gástrico causado pelos AINE, incluindo a aspirina. Um dos fatores que podem levar ao aumento da resistência da mucosa gástrica aos danos causados pelos AINE é a produção aumentada das

lipoxinas, devido a elevação da COX-2 induzida pela inflamação da mucosa gástrica (WALLACE, 2003).

1.2.3 Fatores Protetores

O primeiro nível de defesa do estômago consiste de fatores secretados no lúmen incluindo ácido gástrico, bicarbonato, muco, imunoglobulinas e outras substâncias antibacterianas (WALLACE & GRANGER, 1996). O ácido pode ser visto como a primeira linha de defesa da mucosa, por causa de sua importância na redução da possibilidade de colonização bacteriana no estômago. Da mesma forma, o muco secretado na superfície luminal tem um importante papel na prevenção da colonização bacteriana e translocação (WALLACE, 2001 a). O epitélio se encontra logo abaixo ao muco e também é uma barreira de proteção a difusão passiva. O epitélio é capaz de se reparar rapidamente caso sofra uma agressão, devido a rápida proliferação que essas células possuem, assim, o epitélio apresenta grande capacidade de regeneração (WALLACE & GRANGER, 1996).

A microcirculação da mucosa gástrica é alterada pelos mediadores secretados pelos nervos sensoriais aferentes, localizados na mucosa e submucosa gástrica. A difusão de ácido ou toxinas para a mucosa gástrica resulta em uma elevação do fluxo sangüíneo, que é essencial para limitar os danos e facilitar a reparação celular (WALLACE & GRANGER, 1996).

Ainda existe a linha de defesa representada pelo sistema imune, que consiste de várias “células de alarme”, como os mastócitos e macrófagos, que reconhecem a entrada de invasores na mucosa e produzem uma resposta inflamatória apropriada (WALLACE & GRANGER, 1996).

Células - Os mastócitos e macrófagos residentes na lamina própria atuam como células sinalizadoras da presença de substâncias estranhas. Essas células são capazes de liberar uma grande quantidade de mediadores inflamatórios e citocinas que podem alterar o fluxo sangüíneo da mucosa e aumentar o recrutamento de granulócitos para a região afetada. Tem sido sugerido que a

estabilização dos mastócitos pode ser um mecanismo chave através do qual as PGs possam proteger o estômago de danos. Além disso, as PG são potentes inibidores da liberação de grande número de mediadores dos mastócitos, incluindo PAF (fator de agregação plaquetária), HA (histamina) e TNF- α (fator de necrose tumoral α) (HOGABOAM et al., 1993)

Epitélio - O epitélio é especializado de forma a manter sempre as suas funções como uma barreira ao ácido gástrico e a outros agressores. A grande capacidade de proliferação do epitélio lhe confere habilidade de reparação ao dano epitelial e contribui para a resistência da mucosa gástrica contra as lesões (WALLACE, 2001 a). O epitélio é continuamente renovado, sendo que as células velhas são expulsas para o lúmen se juntando ao muco. O epitélio gástrico humano possui um ciclo de renovação celular de cerca de 2 a 4 dias, ou seja, a cada 3 dias todo o epitélio gástrico é renovado, mesmo que essas células estejam íntegras (WRIGHT, 1984).

Mucosa - A capacidade da mucosa gástrica em resistir a lesões por secreções endógenas (ácido, pepsina e bile) e por ingestão de agentes irritantes (álcool e AINE) pode ser atribuída a numerosos fatores que tem sido coletivamente referidos como defesa da mucosa (WALLACE, 2001 a).

O Muco também tem um importante papel na prevenção da agressão mecânica ao epitélio e fornece um microambiente sobre a área lesionada que é rapidamente restituída (WALLACE et al., 1986). O muco em combinação com o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais, tem um importante papel na proteção gástrica à lesão induzido por ácido e pepsina (ALLEN et al., 1980). A secreção de muco e bicarbonato são alguns dos recursos regulados pela síntese de prostaglandinas. Assim, os AINE podem reduzir a secreção de muco e bicarbonato aumentando assim a susceptibilidade da mucosa a lesão (WALLACE, 2001 a).

Circulação - Um importante papel na proteção contra danos à barreira de muco do estômago é feita pela microcirculação gástrica (KWIECIEN et al., 2002 b). Em adição ao fornecimento de nutrientes e oxigênio ao epitélio, a

microcirculação também remove, dilui e neutraliza substâncias tóxicas que se difundem do lúmen para a mucosa (WALLACE & GRANGER, 1996).

A diminuição da perfusão sangüínea da mucosa gástrica resulta em formação de erosões e úlcera. Os principais fatores que regulam esse fluxo são as prostaglandinas, peptídeos liberados dos terminais nervosos aferentes (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP) e o óxido nítrico. A função do NO na regulação do fluxo sangüíneo gástrico, que participa na manutenção da integridade da mucosa, tem sido objeto de vários estudos (KWIECIEN et al., 2002 b).

Prostaglandinas - As prostaglandinas têm efeito na motilidade, secreção e citoproteção do trato gastrointestinal. As PGE2 podem influenciar de duas maneiras a secreção ácida gástrica. Em baixas concentrações inibem a secreção ácida através da interação com receptores EP3 e em concentrações maiores estimulam a secreção ácida através da interação com receptores EP4. Ambos os receptores estão presentes nas células parietais e nas células principais da mucosa gástrica (DING et al, 1997).

Muitas prostaglandinas (PG) incluindo PGE2 e PGI2 previnem a formação da úlcera por um mecanismo adicional a inibição da secreção gástrica, chamado de citoproteção gástrica (TAKEUCHI et al., 2001). A secreção de muco e bicarbonato, a vasodilatação e a rápida regeneração epitelial são alguns dos componentes de defesa da mucosa que são regulados pelas PG (WALLACE & GRANGER, 1996).

A inibição da produção de PG endógena, como a que ocorre pela ingestão de AINE, leva a formação de úlceras no estômago e intestino. A identificação de duas isoformas de PG sintase (ciclooxigenase, COX) no começo dos anos 90, direcionou as atenções para a possibilidade de que a supressão da isoforma COX-2 poderia produzir muitos dos efeitos antiinflamatórios dos AINE, mas poupando a síntese de PG gástrica e, assim, causando menos irritação ao estômago (FLOWER, 2003). Algumas observações sugerem que a COX-2 contribui significativamente para a defesa da mucosa gástrica. Por exemplo, a indução de lesão gástrica em ratos induzido por AINE, requer a inibição de ambas as isoformas, a inibição seletiva de somente uma isoforma de COX não causa

significativo dano gástrico (WALLACE et al., 2000). Além disso, dados de estudos com animais e humanos tem mostrado que a combinação de aspirina com inibidores seletivos de COX-2 resulta em aumento do dano gástrico maior do que os danos observados quando as duas drogas são administradas sozinhas. (FIORUCCI, et al., 2002).

A PGI₂ endógena está envolvida na resposta a lesão ocasionada pelo estresse, mas não na cicatrização da úlcera gástrica pré-formada, além disso, PGI₂ e seus receptores podem ter um papel fundamental na proteção gástrica induzida por capsaicina, mas não na citoproteção adaptativa induzida por irritantes leves. A ação protetora em ambos os casos é dependente de PG endógena, ainda que os receptores envolvidos nessa ação mostrem ser diferentes; os receptores IP estão envolvidos na formação da úlcera, enquanto os receptores EP 1 na úlcera já formada (TAKEUCHI et al., 2001).

Óxido Nítrico (NO) - Três genes independentes codificam a óxido nítrico sintase neuronal, endotelial e induzida (nNOS, eNOS e iNOS respectivamente), cada uma com capacidade de gerar NO através de mecanismos regulatórios complementares e distintos. Através dessa via o NO se liga ao grupo heme da guanilato ciclase (GC) que estimula a enzima a gerar guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), que gera uma corrente de fosforilações conduzindo a funções efetoras (SHAH et al., 2004). O NO também pode mediar sinalizações independentemente da ativação da GC, por exemplo, regulando diretamente as funções dos canais iônicos, de enzimas e de várias outras proteínas (STAMLER et al., 2001).

O óxido nítrico (NO) tem um papel chave na perfusão e regulação vascular por promover a vasodilatação pela sinalização da célula muscular lisa via GMPc (SHAH et al., 2004). O principal fluxo sanguíneo para o TGI chega através da veia mesentérica, e a regulação do fluxo até as arteríolas mesentéricas é um passo importante para a regulação do fluxo sanguíneo intestinal geral e local (SHAH et al., 2002).

A produção constitutiva de NO é importante para manter a barreira protetora da mucosa gastrointestinal. Esse mecanismo protetor do NO pode ser devido a

sua capacidade em aumentar do fluxo sanguíneo da mucosa e estabilizar a influência dos mastócitos (ALICAN et al., 1996). Entretanto, o excesso na produção de NO associado com estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do NO na permeabilidade da mucosa e proteção. (SHAH et al., 2004)

Estudos clínicos têm demonstrado que a co-administração de agentes doadores de NO com AINE podem proteger contra a indução da úlcera pelos AINE, e a combinação aos AINE de uma molécula que libere NO pode resultar em menos dano a mucosa, quando comparada com os tradicionais inibidores de COX, e podem até aumentar a reparação do tecido mucoso (SHAH et al., 2002).

Lipoxinas - A síntese das lipoxinas ocorre via COX-2, mas não via COX-1 (FIORUCCI, et al., 2002). A lipoxina A4 tem um potente efeito inibitório na quimiotaxia de neutrófilos, aderência, transmigração e produção de ânions superóxidos, aumentando, assim, a integridade epitelial da mucosa gástrica (WALLACE, 2003). A acetilação da COX-2 pela aspirina pode desencadear a produção das lipoxinas (CLARIA & SERHAN, 1995), que tem um potente efeito protetor gástrico (FIORUCCI, et al., 2002).

Sistema antioxidante - A interleucina 1-beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) são as principais citocinas pró-inflamatórias, tendo um importante papel na produção da inflamação aguda (KONTUREK et al., 2000). Essa inflamação aguda é acompanhada por infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica. Os neutrófilos produzem o anion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que pertence ao grupo das espécies reativas de oxigênio (ERO). O radical superóxido reage com os lipídios celulares, levando a formação de peróxidos de lipídio, que são metabolizados a malondialdeído (MDA) e a 4-hidroxinonenal (4-HNE) (KWIECIEN, et al., 2002 a).

O organismo tem muitos sistemas enzimáticos, que capturam as ERO e previnem sua ação destrutiva (KWIECIEN, et al., 2002 a). A principal enzima antioxidante é a superóxido dismutase (SOD) (BRZOZOWSKI et al., 2001), a qual

pode ser distinguida entre: citoplasmática, mitocondrial e extracelular. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em um peróxido (H_2O_2) menos lesivo, que posteriormente é degradado pela catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx) (KWIECIEN, et al., 2002 a). A CAT é uma enzima que acelera a degradação do H_2O_2 em água e oxigênio (HALLIWELL 1990). A segunda via do metabolismo do H_2O_2 depende da ativação da GPx e da cooperação da glutathione redutase (GR). A redução do H_2O_2 em água pela GPx é acompanhada da conversão de glutathione da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) (KWIECIEN, et al., 2002 a).

CGRP / capsaicina – No estômago, CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) está presente nos terminais periféricos dos nervos aferentes sensíveis a capsaicina. CGRP mostrou efeitos gastroprotetores quando foram induzidas lesões por etanol, indometacina e aspirina. Em estômago de ratos, seu efeito gastroprotetor é mediado principalmente pelo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica através do aumento da produção de NO (KAWASHIMA et al., 2002).

A via da capsaicina inclui fibras nervosas sensoriais sensíveis a capsaicina, que liberam CGRP, e aumentam a formação de óxido nítrico (KAUNITZ & AKIBA, 2004). Estas terminações nervosas e os mediadores estão envolvidos com a resposta protetora da mucosa ao ácido luminal, incluindo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e da secreção de muco e bicarbonato. Takeuchi e colaboradores (2002) demonstraram que a capsaicina protegeu contra lesões gástricas provocadas por HCl/etanol, proteção essa que foi abolida pela indometacina quando administrada junto com a capsaicina.

Os nervos sensoriais primários sensíveis a capsaicina servem para a condução da informação nociceptiva para o SNC, mas também são capazes de liberar neurotransmissores dos terminais periféricos ativados (DEMBINSKI et al., 2005). Baixas doses de capsaicina estimulam os nervos sensoriais primários pela abertura de canais de cátions não seletivos complexados com receptores vanilóides, resultando em liberação local de neurotransmissores como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (Ren et al., 1993). Por

outro lado, doses neurotóxicas de capsaicina levam a eliminação dos nervos sensoriais com diminuição dos níveis plasmáticos e teciduais de CGRP (DEMBINSKI et al., 2005).

Receptor Ativado por Proteinase - Recentemente, outro sistema de sinalização tem sido estudado na proteção gastrointestinal: o receptor ativado por proteínases (PAR) (KAWABATA, 2003). Esses receptores, que são fartamente expressos em todo o trato gastrointestinal e conectados a órgãos secretórios, são expressos principalmente nas células musculares lisas, mas também ocorrem na mucosa gastrointestinal (KAUNITZ & AKIBA, 2004).

PAR são ativados por proteínases, que exibem uma seqüência N-terminal oculta que funciona como um elo de ligação para ativar o receptor. A mucosa gástrica tem dois desses receptores, PAR-1 e PAR-2, que são associados a gastroproteção (KAWABATA, 2003). A ativação de PAR-2 mimetiza a resposta da mucosa ao ácido luminal, com um aumento na secreção de muco e do fluxo sanguíneo da mucosa, acompanhada pela inibição da secreção ácida gástrica. Essas respostas são dependentes da presença de terminações nervosas sensíveis a capsaicina e CGRP.

1.2.4 Secreção Ácida Gástrica

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido. O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas e a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12. Ele também impede a entrada de bactérias no organismo. Quando os mecanismos homeostáticos estão prejudicados o volume e a acidez gástrica podem aumentar desproporcionalmente, superando assim as defesas da mucosa gástrica, levando a formação de úlcera duodenal, úlcera gástrica e doença do refluxo gastro-esofágico (Revisado por SCHUBERT, 2004).

1.2.4.1 Mecanismos centrais

O nervo vago contém fibras aferentes que transmitem informações sensoriais do estômago até o tronco cerebral e fibras eferentes que formam o tronco motor dos reflexos vago-vagais (TEBBE et al., 2003, MONDAL et al., 2003). É bem descrito na literatura que os mecanismos sensoriais não participam somente da secreção, mas também da absorção de alimento, motilidade, defesa do tecido e perfusão vascular. Além disto a fase cefálica da secreção ácida gástrica é induzida pelos sinais sensoriais do pensamento, visão, olfato, sabor e deglutição do alimento e isto é abolido pela vagotomia e pode contribuir em mais de 50% de toda a produção ácida em resposta ao alimento (Revisado por SCHUBERT, 2004).

O cérebro regula a secreção ácida gástrica através de vários efeitos centrais, os mecanismos pelos quais os neurotransmissores e neuropeptídeos atuam na secreção ainda é objeto de pesquisas. Estudos descrevem que: i-) a administração (no ventrículo cerebral lateral em ratos) de cainato (MINOWA et al., 2004), NMDA (TSUCHIYA et al., 2001) e agonistas dos receptores κ -opiídeos (ISHIHARA et al., 2001) estimula a secreção ácida gástrica via neurônios vagais colinérgicos; ii-) Receptores de glutamato, especialmente o tipo não-NMDA, estão envolvidos na secreção ácida gástrica através da ativação de receptores κ -opiídeos na região do encéfalo próxima ao ventrículo cerebral lateral de ratos e iii-) A injeção de capsaicina em ratos estimula a secreção ácida gástrica via neurônios colinérgicos eferentes (MINOWA et al., 2004).

1.2.4.2 Mecanismos periféricos

1.2.4.2a Estimulantes

Gastrina - A gastrina, produzida pelas células G, é o principal hormônio estimulante de secreção ácida durante a ingestão de alimentos. A gastrina também regula o crescimento normal de tecido e de células tumorais no TGI.

Gastrina e colecistocinina (CCK) possuem uma seqüência pentapeptídica carboxi-terminal idênticas. Duas principais classes de receptores de gastrina/CCK são bem caracterizadas: CCK-1 (ou CCK-A) e CCK-2 (ou CCK-B). Os receptores de CCK-1 são específicos para CCK, enquanto que os receptores CCK-2 reconhecem tanto CCK como gastrina com alta afinidade (Revisado por SCHUBERT, 2004). A gastrina, atuando através dos CCK-2, estimula as células parietais diretamente e indiretamente. A estimulação indireta pela gastrina ocorre através de sua ação em receptores CCK-2 presentes nas células enterocromafins, que resulta em liberação de histamina, assim, a histamina irá induzir a secreção ácida atuando em receptores H2 nas células parietais (POMMIER et al., 2003). O segundo mensageiro responsável pela ação da gastrina é o cálcio (Revisado por SCHUBERT, 2004).

Histamina - No estômago, a histamina é principalmente estocada em células do tipo enterocromafin que residem na parte basal das glândulas oxínticas. Os receptores de histamina têm sido classificados em quatro grandes subclasses: H1, H2, H3 e H4. O hormônio antral gastrina e o mediador neuronal simpático Peptídeo Ativador de Adenilato Ciclase Pituitário (PACAP) estimulam a síntese de histamina, armazenamento e secreção pelas células do tipo enterocromafins (ECL) (PRINZ et al., 2003). A histamina liberada se difunde para as células parietais vizinhas e estimula a secreção ácida pela interação com os receptores H2 expressos na superfície da célula parietal.

Acetilcolina - A acetilcolina liberada do sistema nervoso entérico, estimula diretamente a secreção de ácido através da ativação dos receptores M3 nas células parietais, mediado pelo segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclica (AMPc). A acetilcolina também pode aumentar a secreção ácida gástrica de maneira indireta, através da estimulação de células ECL secretoras de histamina. Receptores do tipo M1 presentes nas células ECL quando bloqueados por antagonistas específicos M1 inibem a liberação de histamina, reduzindo a secreção ácida gástrica.

1.2.4.2b Inibidores

Somatostatina - No estômago a somatostatina, presente nas células D, inibe a secreção ácida atuando diretamente nas células parietais pela inibição da enzima $H^+K^+/ATPase$ e indiretamente por inibir a secreção de histamina pelas células ECL e inibir a secreção de gastrina pelas células G. A ação da somatostatina é mediada via cinco subtipos de receptores acoplados a proteína G, SSTR1 a SSTR5. (Revisado por SCHUBERT, 2004).

Adrenomedulina - Adrenomedulina é um aminoácido recentemente caracterizado que recebeu esse nome por causa de sua alta concentração na medula adrenal. Adrenomedulina está presente nas células ECL e nas células principais no fundo gástrico (HIRSCH et al., 2003). A adrenomedulina tem um papel importante na defesa e reparo da mucosa gástrica. FUKUDA et al. 1999 demonstraram que a adrenomedulina promove a restituição epitelial e WANG et al. 1999 demonstraram que sua expressão é aumentada após danos a mucosa. Em estudos *in vitro* com estômagos de ratos e camundongos, a adrenomedulina, atua via neurônios intramurais, estimulando a secreção de somatostatina e, assim, inibindo a liberação de histamina e a secreção ácida (GOMEZ et al., 2004; HIRSCH et al., 2003)

Amilina - A amilina tem a mesma localização que a somatostatina em células endócrinas do fundo gástrico. Em estômagos de ratos e camundongos, a amilina, liberada de células D contendo somatostatina, interage com receptores distintos de amilina para aumentar a secreção de somatostatina por uma via autócrina que leva a inibição de histamina e da secreção ácida (Revisado por SCHUBERT, 2004).

Peptídeo natriurético atrial - Em estômago de ratos e humanos o peptídeo natriurético atrial (ANP) endógeno atua em receptores NPR-A estimulando a secreção de somatostatina do antro e fundo gástrico (CHEY et al., 2003). A estimulação de somatostatina é acompanhada pela inibição da secreção de gastrina no antro e inibição da secreção de histamina no fundo gástrico (Revisado por SCHUBERT, 2004).

Prostaglandinas - As prostaglandinas (PGs) exercem efeitos inibitórios sobre a célula parietal, e a inibição da sua síntese pode resultar em um aumento da secreção ácida gástrica (WALLACE, 2001 b). As PGs unem-se ao receptor de PGE₂ na célula parietal e ativam uma proteína G inibitória (G_i), que inibe a enzima adenilato ciclase. As PGs endógenas modulam a secreção ácida pelo bloqueio do aumento de AMPc estimulado por histamina dentro da célula parietal (ATAY et al., 2000).

1.2.4.3 Mecanismo intracelular

A H⁺/K⁺/ATPase é a enzima responsável pela secreção ácida gástrica. A subunidade α é a responsável pela troca de H⁺ por K⁺ com gasto energético fornecido pela catalisação do ATP. Nas células parietais em repouso, a bomba de H⁺/K⁺/ATPase é armazenada em tubulovesículas citoplasmáticas. Quando os receptores das células parietais são estimulados por seus agonistas, são gerados segundos mensageiros, que através de cascatas de fosforilação permitirão com que as tubulovesículas contendo as enzimas se fundam com a membrana apical, permitindo com que a enzima transmembrânica se torna ativa. Na ausência do estímulo, as bombas são recicladas de volta para o compartimento citoplasmático. Inibidores das bombas de próton são pró-drogas que sofrem catalisação ácida com um rearranjo químico nos canalículos secretórios, permitindo, assim, a inibição da H⁺/K⁺/ATPase através da ligação covalente a resíduos de cisteína na subunidade α (Revisado por SCHUBERT, 2004).

Em humanos, a secreção ácida aumentada retorna ao nível normal, com a administração de inibidores irreversíveis da bomba de prótons, como o lansoprazol, omeprazol e pantoprazol (Revisado por SCHUBERT, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estudar os efeitos e vias envolvidas nas ações do extrato bruto hidroalcoólico das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae) sobre o trato gastrointestinal.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a ação protetora gástrica, *in vivo*, do extrato bruto hidroalcoólico da *T. avellanedae* via oral, através dos modelos de úlcera aguda induzidas por etanol e ibuprofeno.
2. Avaliar a ação protetora gástrica, *in vivo*, do extrato bruto hidroalcoólico da *T. avellanedae* via intraperitoneal, através do modelo de úlcera aguda induzida por etanol.
3. Avaliar a ação protetora gástrica, *in vivo*, do extrato bruto hidroalcoólico da *T. avellanedae* via oral, através do modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético.
4. Avaliar a atividade seqüestradora do radical livre DPPH *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico da *T. avellanedae* e de suas frações.
5. Avaliar a ação antissecretora ácida gástrica, *in vivo*, do extrato hidroalcoólico da *T. avellanedae* através do modelo de ligadura do piloro.
6. Verificar os mecanismos de ação do efeito antissecretor ácido do extrato hidroalcoólico da *T. avellanedae* em modelos *in vivo*, através do modelo da ligadura do piloro com secretagogos (histamina, pentagastrina e betanecol), e *in vitro* através da atividade da enzima $H^+/K^+/ATPase$.
7. Avaliar a participação da via colinérgica na atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico da *T. avellanedae* através da alteração da motilidade gastrointestinal *in vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material Botânico

O material botânico, cascas de *Tabebuia avelanadea* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae) devidamente identificada e armazenada em saco impermeável, foram fornecido pela empresa Chamel Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda.

3.1.1.1 Obtenção do Extrato

O extrato bruto hidroalcoólico das cascas de *Tabebuia avelanadea* Lorentz ex Griseb foi obtido pelo Prof. Dr. Moacir Pizzolatti do Departamento de Química da UFSC.

Cascas de *Tabebuia avelanadea* (5 Kg) foram trituradas a fino grão e extraídas por maceração a temperatura ambiente durante sete dias com etanol 95%. O extrato obtido foi filtrado e concentrado, até a completa remoção do solvente extrator, em rotaevaporador sob pressão reduzida na faixa de temperatura 40-50°C. O solvente recuperado foi utilizado para uma segunda extração repetindo o procedimento descrito. Após a remoção do solvente extrator, o extrato ficou com um teor de 3% de água, determinado por gravimetria (a concentração do extrato, portanto, é de 97%). Obteve-se um total de 919,17 g do extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI) o que corresponde a 18,38 % de rendimento.

Parte do extrato bruto hidroalcoólico (200 g) foi redissolvido numa quantidade mínima de acetona, misturado a 300 g de gel de sílica e misturado manualmente com um bastão de vidro até a completa evaporação do solvente. Este procedimento resultou numa “farofa de sílica” contendo o EHI adsorvido. O extrato assim preparado foi então submetido a um fracionamento em coluna de sílica gel

eluída com misturas de hexano / acetato de etila / etanol, coletando-se um total de 70 frações de aproximadamente 80-120 ml cada. As frações assim obtidas foram analisadas por cromatografia em camada fina (CCF) e reunidas conforme a similaridade do perfil químico apresentado, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Frações obtidas a partir do EHI.

Proporção Hexano:AcOEt:EtOH	Frações com o mesmo perfil químico por CCF	Rendimento
1:2:0	1-32	10,239 g
0:1:0	33-37	10,086 g
0:3:1	38-43	8,472 g
0:3:2	44-54	11,922 g
0:1:1	55-65	10,478 g
0:0:1	66-70	115,565 g

Das frações obtidas do EHI, foram utilizadas nesse trabalho as frações com o mesmo perfil químico analisadas por CCF que foram reunidas nas frações de 33-37 (F33), 45-54 (F45) e 55-65 (F55).

3.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) adultos, machos e fêmeas com peso variando entre 15 a 35 g; ratos (*Ratus norvegicus*), linhagem Wistar, fêmeas adultas pesando de 180 a 250 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação, tendo livre acesso à água e ração. Também foram utilizados coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*), pesando cerca de 2 kg, adquiridos na Cooperativa dos Produtores de Coelho do Estado do Paraná (Coelho Brasil), São José dos Pinhais, PR, e foram trazidos no momento do experimento. Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética (número 161) da Universidade Federal do Paraná.

3.1.3 Drogas, Reagentes, Solventes e Sais

Utilizou-se: ácido sulfúrico, cloreto de sódio, fosfato de potássio (Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), adenosina 5-trifosfato (ATP), alcian blue, atropina, coquetel inibidor de ATPase, ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB), molibdato de amônio, glutatona forma reduzida, ácido etilenoglicol-tetracético (EGTA), albumina bovina, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), omeprazol (Sigma, Saint-Louis, EUA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), ácido ascórbico (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), sacarose (Synth, Diadema, Brasil), álcool metílico (Ecibra, Santo Amaro, Brasil), ácido tricloroacético P.A, hidróxido de sódio, vermelho de fenol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), cloreto de magnésio, cloreto de potássio (Carlo Erba, Rodano, Itália), fenolftaleína (FarmanilQuima, Curitiba, Brasil), éter etílico P.A (Biotec, São José dos Pinhais, Brasil), metoclopramida (Aventis), carboximetilcelulose, ibuprofeno (Sigma, Saint-Louis, EUA) e cloprostenol sódico (Schering-Plough, Cotia, São Paulo).

3.1.4 Equipamentos

Utilizou-se: agitador de tubos (AP56 Phoenix), agitador de eppendorfs (Marconi), agitador magnético (Fisatom), balanças analíticas (AL500 Marte, AS200 Ohaus e AC210S Sartorius), centrífuga refrigerada (Christ), dispensador (Boeco), espectrofotômetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech), homogeinizador (MA 102 Marconi), estufa (Odontobras), leitor de placas (Tecsán), pipetas automáticas (Eppendorf), ultra-som (Unique) e ultra centrífuga (HITACHI Himac CP90B).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *T. avellanae* em modelo de úlcera aguda

3.2.1.1 Lesões gástricas induzidas por etanol

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Grupos de 6 animais foram tratados por via oral ou intraperitoneal com o veículo (água - 0,1 mL/100 g), o omeprazol (40 mg/kg) e o extrato (em 3 doses). Uma hora após o tratamento via oral ou 30 minutos após o tratamento via intraperitoneal, foi administrado etanol (80%, 0,5 mL/200 g – v.o). O grupo controle não lesado não recebeu etanol, somente água via oral. Uma hora após a administração do agente necrotizante, os animais foram mortos através de deslocamento cervical e os estômagos abertos para mensuração da área lesada.

As lesões foram quantificadas medindo a área total lesionada de cada estômago (em mm²), o resultado foi expresso em média de área lesada em mm² da mucosa gástrica.

3.2.1.2 Quantificação do muco gástrico

Após a avaliação das lesões induzidas por etanol 80 %, o fundo e o antro do estômago foram retirados e a parte glandular foi dividida em duas. Uma parte da mucosa gástrica (com peso exato determinado) foi incubada em 10 mL de solução de Alcian Blue 0,1%, onde permaneceu corando por 2 horas. O excesso de Alcian Blue foi removido com sacarose 0,25 mol/L (foram realizadas duas lavagens sucessivas, a primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos). O corante complexado com o muco da parede glandular foi extraído com 5 mL de cloreto de magnésio (0,5 mol/L), agitando-se intermitentemente, cada segmento, por 1 minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. Misturou-se 3 mL da solução

sobrenadante azul obtida com 3 mL de éter etílico e agitou-se vigorosamente até a formar uma emulsão. Centrifugou-se a 3600 rpm x 10 minutos para separar a fase aquosa, descartando o resíduo. A concentração de Alcian Blue nas amostras, foi determinada por leitura espectrofotométrica a 598 nm.

A concentração de Alcian Blue ligado ao muco foi determinada por interpolação na curva padrão do corante e expressa em μg de Alcian Blue/mL/g de tecido.

3.2.1.3 Lesões gástricas induzidas por ibuprofeno

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Grupos de 6 animais foram tratados por via oral com o veículo (água - 0,1 mL/100 g), com a prostaglandina sintética cloprostenol (50 $\mu\text{g/kg}$, v.o) e o extrato do ipê-roxo (em 3 doses). Uma hora após estes tratamentos, foi administrado ibuprofeno (400 mg/kg, v.o). Cinco horas após a administração do agente necrotizante, os animais foram mortos através de deslocamento cervical e os estômagos abertos para mensuração da área lesada. Um grupo controle não lesado não recebeu ibuprofeno, recebeu somente água.

As lesões foram quantificadas medindo a área total lesionada de cada estômago (em mm^2), o resultado foi expresso em média de área lesada em mm^2 da mucosa gástrica.

3.2.2 Avaliação da atividade antiulcerogênica em modelo de úlcera crônica

3.2.2.1 Lesões gástricas induzidas por ácido acético

Grupos de ratas foram submetidas a uma dieta alimentar (fornecimento de ração: 9h30-10h30 e 15h30-16h30) e água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com éter etílico e realizada a laparotomia. Após exposição do estômago, foram injetados 50 μL de ácido acético 20% ou 50 μL de salina 0,9% na

subserosa da parede gástrica anterior. O estômago foi lavado externamente com salina 0,9% e suturada a parede abdominal. Após a recuperação da anestesia, os animais retornam ao biotério e continuaram sob regime de restrição alimentar com consumo livre de água.

Os tratamentos veículo (água - 0,5 mL/100 g), omeprazol (20 mg/kg) e as diferentes doses do extrato foram iniciados somente sete dias após a cirurgia e foi realizado durante os 7 dias seguintes, 30 minutos após o fim do consumo de ração. Ao final do tratamento, os animais foram mortos, o estômago removido e esticado para posterior inspeção da mucosa. Foram medidas as áreas superficiais das lesões e sua profundidade, sendo o valor expresso em mm³.

3.2.2.2 Atividade da MPO

Após a análise das úlceras induzidas por ácido acético 20%, elas foram coletadas e homogeneizadas em tampão fosfato 80mM com HTAB 0,5%. Após a homogeneização foram centrifugadas em 13000 rpm por 20 minutos a 4° C. 5 µL de cada sobrenadante foi colocado na placa onde foi adicionado 225 µL de uma solução contendo: 112,5 µL de PBS 80mM, 95,625 µL de PBS 0,22 mM – pH 5,4 e 16,875 µL de H₂O₂ 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de TMB diluído em dimetilformamida e posteriormente incubada durante 3 minutos a 37° C. A reação foi interrompida com a adição de 30 µL de NaOAc 1,46M – pH3 e a atividade enzimática determinada colorimetricamente em espectrofotômetro a 620nm.

3.2.3 Estudo *in vitro* da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)

A reatividade do extrato hidroalcoólico do ipê-roxo com o radical livre estável 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil(DPPH) foi determinada através de medidas de alteração da absorvância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958) e CHEN et al (2004), com algumas modificações. O sistema de reação foi

constituído de 750 µL de solução teste (extrato) e 250 µL de solução metanólica de DPPH (1mg em 25 ml). Após 5 minutos, o decréscimo da absorvância foi medido. Solução do agente redutor, ácido ascórbico (50 µg/ml), foi utilizada como controle positivo do teste e como grupo controle negativo foi utilizado água destilada.

3.2.4 Avaliação da atividade antissecretora ácida

3.2.4.1 Ligadura de Píloro em ratos

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. As ratas foram anestesiadas com éter e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do píloro com fio de sutura. Por via intraduodenal, os animais recebem o veículo (água - 0,1 mL/100 g), o omeprazol (40 mg/kg) e o extrato (em 3 doses). A seguir, foi suturada a parede abdominal. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia etérea profunda e seus estômagos foram removidos após o pinçamento do esôfago para evitar a perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, secado em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta. A acidez total (mEq[H⁺]/mL/4 h) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base.

3.2.4.2 Ligadura de Píloro em ratos estimulados com os secretagogos betanecol, pentagastrina e histamina

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos que receberam

os seguintes tratamentos: 1) betanecol + atropina, 2) betanecol + extrato, 3) betanecol, 4) pentagastrina + extrato, 5) pentagastrina, 6) histamina + cimetidina, 7) histamina + extrato, 8) histamina, 9) extrato e 10) controle (água). As ratas foram anestesiadas com éter e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do piloro com fio de sutura. Os tratamentos ocorreram da seguinte forma, no momento da ligadura foi administrado veículo água 0,1 mL/100g, cimetidina 60 mg/kg e o EHI 400mg/kg todos por via intraduodenal e por via sub-cutânea a atropina 1mg/kg. A seguir, foi suturada a parede abdominal. Após 1h da ligadura os animais receberam pela via subcutânea os estímulos secretagogos histamina 20mg/kg, pentagastrina 400µg/kg e betanecol 2,5mg/kg. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia etérea profunda e seus estômagos foram removidos após o pinçamento do esôfago para evitar a perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, secado em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta. A acidez total (mEq[H⁺]/mL/4 h) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base.

3.2.4.3 Ensaio da Atividade Enzimática da H⁺/K⁺/ATPase

A atividade da enzima H⁺/K⁺/ATPase, obtidas de estômago de coelhos, foi determinada mediante a quantificação do fósforo inorgânico (Pi) liberado da hidrólise de ATP exógeno, na presença de K⁺. A reação foi iniciada pela adição da enzima a 150 µL de tampão Tris HCl (pH 7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5 mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP, na ausência e na presença do EHI. A reação foi interrompida, após 20 min de incubação a 37 °C, pela adição de 50 µL de ATC (ácido tricloroacético) 50 % e esfriamento rápido em banho de gelo. A quantificação do fosfato inorgânico liberado foi realizado através da adição de 900

μ L da solução reagente (4,7 mL de água; 0,7 mL de ácido sulfúrico; 10 N; 0,6 mL de molibdato de amônio 2,4 %; e 3 mL de ácido ascórbico 10%) nas amostras, que foram incubadas por 20 min a 37 °C. O produto obtido foi quantificado por leitura espectrofotométrica a 820 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do Pi ($\epsilon = 11000/\text{M}/\text{cm}$).

3.2.5 Avaliação da Motilidade Gastrointestinal

3.2.5.1 Esvaziamento Gástrico de Semi-sólidos

Esse método consiste na administração de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05 % em carboximetilcelulose 1,5 %) e na avaliação na quantidade do marcador que permanece no estômago durante um período de tempo. Após 6 horas em jejum os camundongos receberam os estímulos e o EHI (v.o), e após 30 min (administração s.c) ou 1 hora (administração v.o) dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido. Os estímulos recebidos pelos animais foram atropina (3mg/kg, s.c) e metoclopramida (30 mg/kg, v.o). O grupo controle tempo zero, foi sacrificado por deslocamento cervical, logo após a administração do marcador colorido, e os outros grupos após 20 min da administração. A cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago retirado com seu conteúdo e então aberto e lavado com 7 mL de água destilada. O conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a 1500 x g por 15 min. Foi coletado 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de NaOH 1N (pH 12). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 560 nm, e expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero.

3.2.5.2 Trânsito Intestinal

Esse método consiste na administração de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05 % em carboximetilcelulose 1,5 %) e na avaliação do

trajeto do mesmo no intestino delgado durante um período de tempo. Camundongos, em jejum de 6 horas, foram tratados e após 30 min ou 1 hora dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido. O grupo controle tempo zero foi sacrificado, por deslocamento cervical, logo após a administração. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado foi removido. Com auxílio de uma régua, foi determinado o comprimento do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador (até a última porção que continha pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado.

3.2.6 Expressão dos dados e análise estatística

Os dados foram representados como as médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. Quando apropriado foi utilizado o teste t de Student não pareado. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade protetora gástrica do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo (EHI) em ratos

4.1.1 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo (EHI) via oral sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratos

O EHI reduziu a área de lesão da mucosa gástrica e este efeito ocorreu de forma dependente da dose administrada. As doses do extrato utilizadas, EHI 100, 300 e 1000 mg/kg, promoveram redução da área de lesão de $76,6 \pm 5,1 \text{ mm}^2$ no controle (água) para $28,5 \pm 9,8$, $19,4 \pm 6,5$ e $4,2 \pm 1,3 \text{ mm}^2$, respectivamente. Os animais que receberam omeprazol (40 mg/kg) tiveram a área de lesão reduzida para $34,8 \pm 11,5 \text{ mm}^2$. O grupo controle não lesado, que não recebeu etanol não apresentou lesões gástricas (dados não mostrados). O EHI nesse modelo de lesão apresentou uma DE_{50} de $69,5 \pm 10,4 \text{ mg/kg}$. Estes resultados podem ser observados na figura 4.

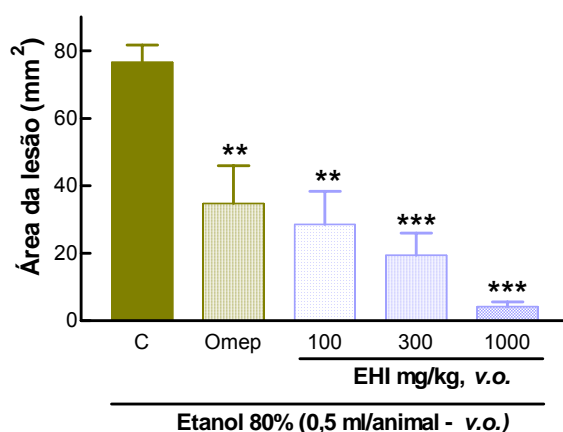


Figura 4: Efeitos do extrato hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI: 100, 300 e 1000mg/kg-vo) e do omeprazol (Omep, 40mg/Kg-vo), sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 80% em ratos (0,5mL, vo). Os animais do grupo controle lesado (C) foram tratados com água. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 5 a 6 animais e indicam a área de lesão da mucosa gástrica após 1 hora da administração do etanol. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

= diferença significativa em relação ao controle $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.

4.1.2 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo via oral sobre a quantidade de Muco Gástrico após a indução de lesões por etanol em ratos

A dose de 100 mg/kg do EHI aumentou a concentração de Alcian Blue (AB) para 416 ± 26 μg de AB/ml/g de tecido, um aumento de 57% do muco gástrico em relação ao controle lesado (261 ± 13 μg de AB/ml/g de tecido) pelo etanol. Estes resultados podem ser observados na figura 5.

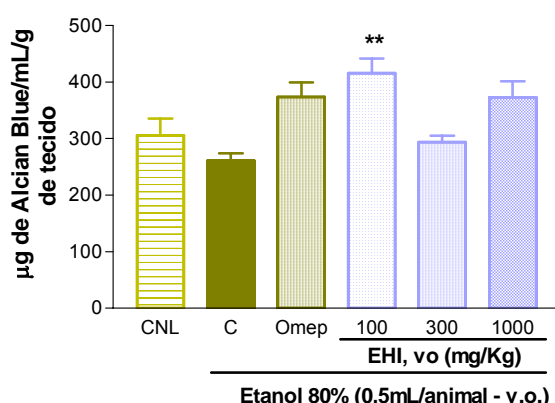


Figura 5: Efeitos do EHI e do omeprazol (Omeprazole, 40 mg/kg) sobre a quantidade de muco gástrico após indução de lesões por etanol 80% em ratos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 5 a 6 animais e indicam a quantidade de Alcian Blue, que é uma medida indireta da quantidade de muco gástrico. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA). CNL= controle não lesado, C= controle lesado.

** $p < 0,01$ = diferença significativa em relação ao controle.

4.1.3 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo (EHI) via intraperitoneal sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratos

O tratamento com EHI pela via intraperitoneal reduziu a área de lesão da mucosa gástrica, e este efeito ocorreu de forma dependente da dose administrada. As doses do extrato utilizadas, EHI 30, 100 e 300 mg/kg, promoveram redução da área de lesão de 121 ± 9 mm^2 no controle lesado (CL) para 106 ± 6 , 80 ± 14 e 23 ± 8 mm^2 , respectivamente, sendo que a dose de 300 mg/kg diferiu estatisticamente do CL e das doses de 30 e 100mg/kg de EHI. Os animais que receberam omeprazol (40 mg/kg) tiveram a área de lesão reduzida para 61 ± 7 mm^2 . O grupo controle não lesado, que não recebeu etanol não apresentou lesões

gástricas (dado não mostrado). O EHI nesse modelo de lesão apresentou uma DE_{50} de 139 ± 36 mg/kg i.p. Estes resultados podem ser observados na figura 6.

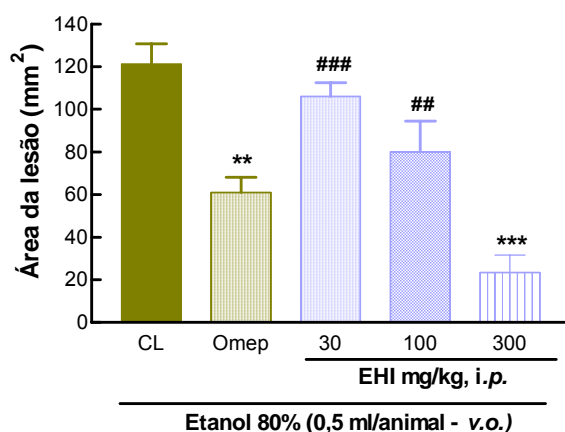


Figura 6: Efeitos do extrato hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI: 30, 100 e 300mg/kg-ip) e do omeprazol (Omep, 40mg/Kg-vo), sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 80% em ratos (0,5mL, vo). Os animais do grupo controle lesado (CL) foram tratados com água. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 5 a 6 animais e indicam a área de lesão da mucosa gástrica após 1 hora da administração do etanol. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

= diferença significativa em relação ao controle $p < 0,01$ e * $p < 0,001$.

= diferença significativa em relação ao EHI 300mg/kg $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$.

4.1.4 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico do Ipê-roxo via intraperitoneal sobre a quantidade de Muco Gástrico após a indução de lesões por etanol em ratos

Quando os animais receberam etanol 80% (grupo controle lesado) a quantidade de muco gástrico foi reduzida de 167 ± 12 μ g de Alcian Blue/ml/g de tecido no controle não lesado para 120 ± 9 μ g de Alcian Blue/ml/g de tecido. A quantidade de muco dos animais tratados com as doses de 30 e 100 mg/kg (*i.p*) do EHI não diferiram do controle lesado (CL), no entanto a dose de 300 mg/kg (*i.p*) aumentou a quantidade de muco gástrico para 212 ± 4 μ g de Alcian Blue/ml/g de tecido de maneira significativa em relação aos grupos controle lesado e controle não lesado (CNL), um aumento de 27% em relação ao CNL e 77% do CL. Estes resultados podem ser observados na figura 7.

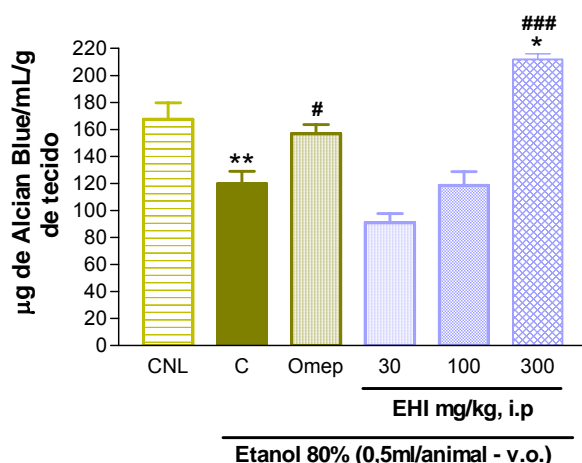


Figura 7: Efeitos do EHI e do omeprazol (Omeprazole, 40 mg/kg) sobre a quantidade de muco gástrico após indução de lesões por etanol 80% em ratos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 5 a 6 animais e indicam a quantidade de Alcian Blue, que é uma medida indireta da quantidade de muco gástrico, após lesão induzida por etanol. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA). CNL= controle não lesado, C= controle lesado.

*= diferença significativa em relação ao controle não lesado $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

= diferença significativa em relação ao controle lesado $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$.

4.1.5 Lesões gástricas induzidas por ibuprofeno em ratos

O EHI protegeu a mucosa gástrica contra as lesões induzidas por ibuprofeno. As doses do extrato utilizadas (EHI 30, 100 e 300 mg/kg) promoveram redução da área de lesão de $46,2 \pm 6,4 \text{ mm}^2$ no controle lesado para $27 \pm 2,8$, $15 \pm 2,2$ e $15 \pm 2,6 \text{ mm}^2$, respectivamente. Os animais que receberam cloprostenol (prostaglandina exógena) tiveram a área de lesão reduzida para $6,4 \pm 2,6 \text{ mm}^2$. O grupo controle não lesado, que não recebeu ibuprofeno não apresentou lesões gástricas (dado não mostrado). Estes resultados podem ser observados na figura 8.

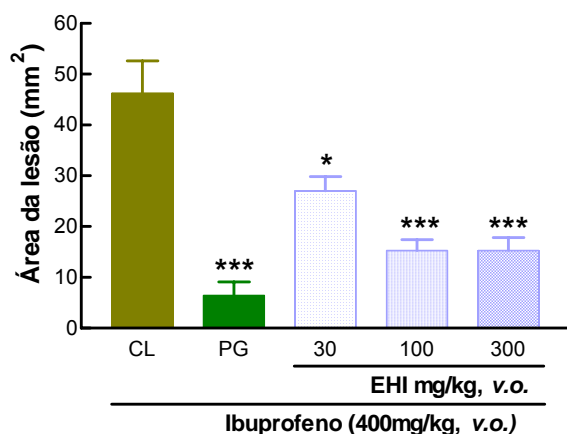


Figura 8: Efeitos do extrato hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI 30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) e do cloprostenol (PG, 50 µg/kg, v.o.), sobre as lesões gástricas induzidas por ibuprofeno (400 mg/kg, v.o.) em ratos. Os animais do grupo controle lesado (CL) foram tratados com água (veículo). As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 5 animais e indicam a área de lesão da mucosa gástrica após 5 horas da administração do ibuprofeno. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle (água).

*= diferença significativa em relação ao controle $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.1.6 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo (EHI) sobre a cicatrização da lesão gástrica crônica em ratos

A injeção de 50 µl de ácido acético 20% na subserosa levou a formação de lesão gástrica nos ratos tratados com água (controle), produzindo um índice de lesão de $165 \pm 19 \text{ mm}^3$. O tratamento por 7 dias com as doses de 50, 100 e 300 mg/kg do EHI promoveu redução da lesão para 121 ± 21 , 62 ± 15 e $34 \pm 6 \text{ mm}^3$, respectivamente. Nos animais que receberam omeprazol (20mg/kg) a lesão foi reduzida para $44 \pm 6 \text{ mm}^3$. O grupo controle não lesado, que recebeu injeção de salina na subserosa, não desenvolveu úlcera (dado não apresentado). O EHI apresentou uma DE_{50} de $85,9 \pm 18,5 \text{ mg/kg}$ nesse modelo de úlcera gástrica. Estes resultados podem ser observados na figura 9.

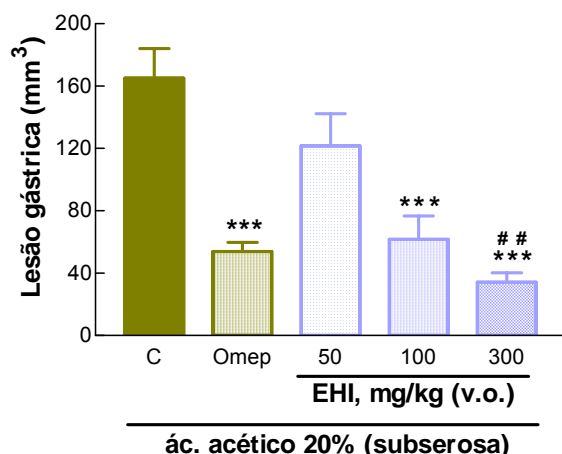


Figura 9: Efeitos do extrato hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI: 50, 100 e 300 mg/kg-vo) e do omeprazol (Omep 20mg/kg) em 7 dias de tratamento duas vezes ao dia, sobre as lesões gástricas induzidas pela aplicação de 50 µl de ácido acético 20% na subserosa do estômago de ratos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 7 a 9 animais e indicam a lesão da mucosa gástrica. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle (água).

***= diferença significativa em relação ao controle $p < 0,001$ ## = diferença significativa em relação à dose 50mg/kg $p < 0,01$.

4.1.7 Efeitos do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) após a indução de úlcera crônica em ratos

A indução do aumento da atividade da MPO induzida pelo ácido acético ($66,5 \pm 8$ mDO/mg de proteína) foi reduzida em 23%, 28% e 27% com o tratamento com EHI nas doses de 50, 100 e 300mg/kg respectivamente, mas essa redução não foi diferente estatisticamente em relação ao controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Estes resultados podem ser observados na figura 10.

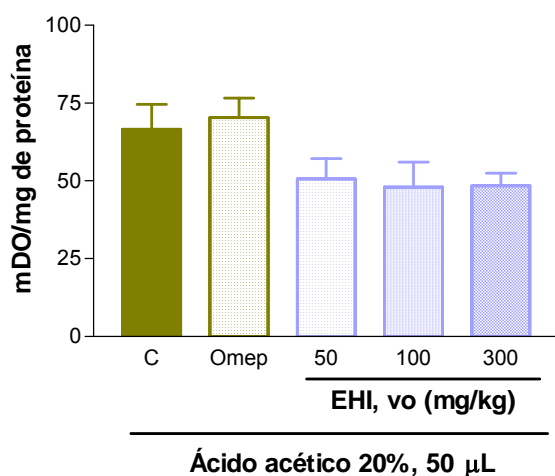


Figura 10: Efeitos do EHI (50, 100 e 300mg/kg-vo) e omeprazol (20 mg/kg) sobre a atividade da MPO induzidas pela lesões gástricas induzidas por ácido acético 20% administrada na subserosa de ratos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 4 a 5 animais. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA).

4.2 Ação seqüestradora de radicais livres do EHI e suas frações sobre o seqüestro do radical DPPH

O ácido ascórbico, reconhecido por suas propriedades antioxidantes, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ seqüestrou o radical livre DPPH, reduzindo para $0,066 \pm 0,002\text{nm}$ de absorvância, enquanto que o controle que não recebeu nenhum agente seqüestrador apresentou uma absorvância de $0,230 \pm 0,015\text{nm}$. O EHI e a fração F33 já com a menor dose (10 $\mu\text{g/mL}$) foram capaz de reduzir os níveis do radical livre DPPH do grupo controle para $0,183 \pm 0,002\text{nm}$ e $0,177 \pm 0,007\text{nm}$, respectivamente. A fração F33, a mais potente, apresentou CE_{50} de $47,9 \pm 10,3 \mu\text{g/mL}$. As CE_{50} determinadas para o EHI e para as frações F45 e F55 foram de $59,2 \pm 7,3 \mu\text{g/mL}$, $97,7 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ e $75,9 \pm 8,1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estes resultados podem ser observados na figura 11.

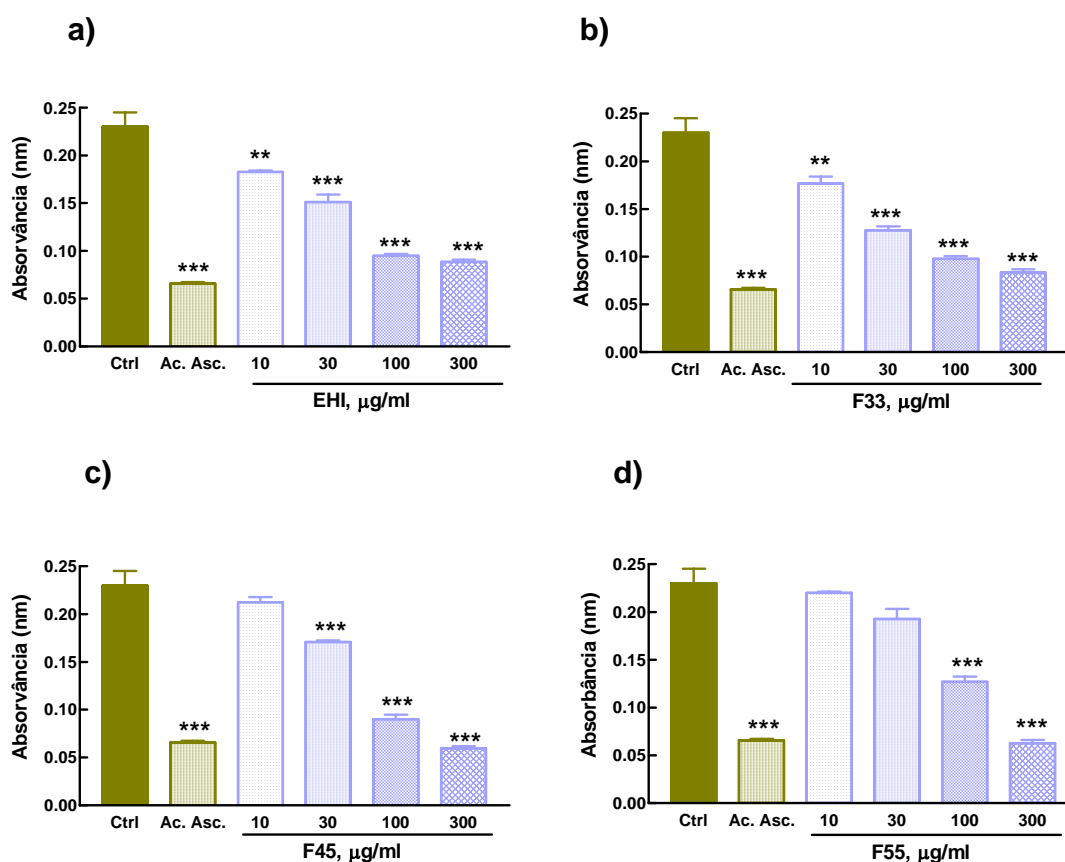


Figura 11: Efeito antioxidante total avaliado na forma de seqüestro do radical livre DPPH *in vitro*: a) EHI, b) F33, c) F45 e d) F55. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Ctrl= controle, corresponde ao grupo que não recebe droga, Ac. Asc.=ácido ascórbico (50µg/ml).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ = diferença significativa em relação ao grupo Ctrl.

4.3 Efeitos anti-secretor do Extrato Hidroalcoólico de Ipê-roxo (EHI)

4.3.1 Efeitos do EHI sobre a secreção ácida gástrica basal em ratos

O EHI reduziu a acidez total da secreção ácida gástrica em relação ao controle ($0,09 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/ml) nas doses administradas de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, para $0,07 \pm 0,009$; $0,05 \pm 0,006$; $0,04 \pm 0,007$ e $0,03 \pm 0,007$ mEq[H⁺]/ml respectivamente, e este efeito ocorreu de forma dependente da dose. Em relação ao volume gástrico secretado, essas mesmas doses do EHI reduziram o volume para $7,8 \pm 1$; $6,4 \pm 0,5$; $5,7 \pm 0,5$ e $6,6 \pm 0,8$ ml respectivamente, quando comparadas

ao volume de secreção ácida gástrica obtida nos animais tratados apenas com água (controle), que foi de $11,2 \pm 0,5$ ml. O omeprazol reduziu a acidez gástrica para $0,009 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/ml e o volume secretado para $4,5 \pm 0,2$ ml. O EHI apresentou uma DE₅₀ de 345 ± 88 mg/kg para acidez total da secreção gástrica. Esses resultados podem ser observados na figura 12.

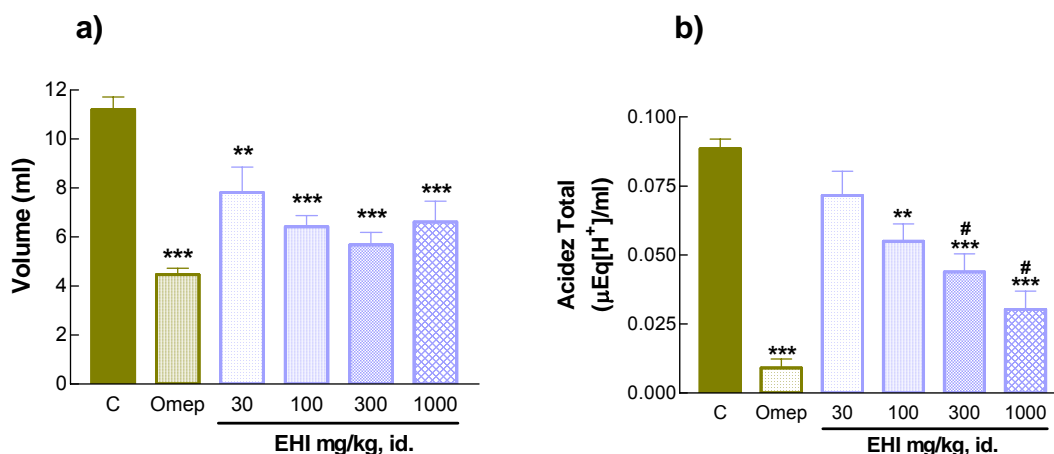


Figura 12: Efeitos do EHI e do omeprazol (Omeprazol, 40 mg/kg v.o) sobre a secreção ácida gástrica de ratos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 6 a 9 animais e representam: a) volume secretado e b) acidez total da secreção, após 4 horas da ligadura do piloro. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle.

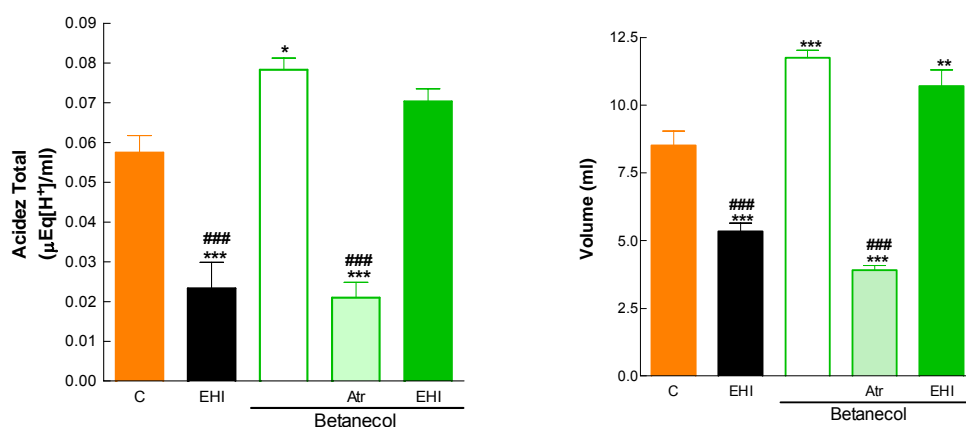
** p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle; # p < 0,05 em relação ao EHI 30mg/kg.

4.3.2 Efeitos do EHI sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina em ratos

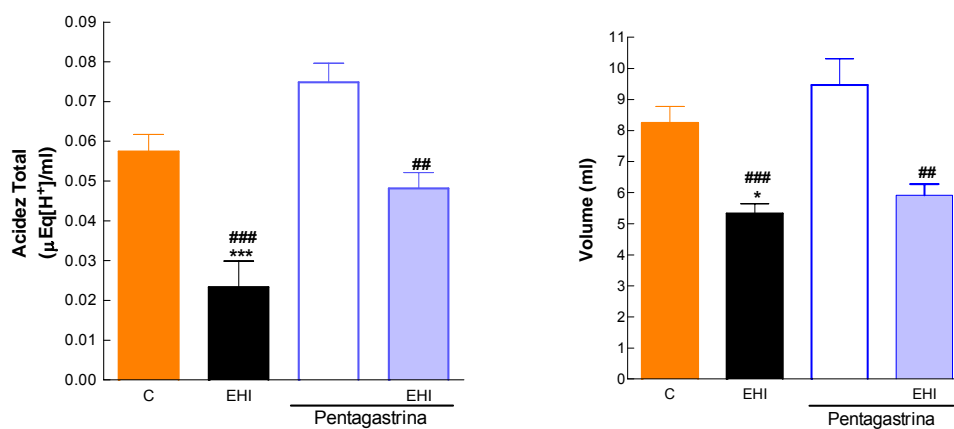
O betanecol, a pentagastrina e a histamina aumentaram o volume da secreção ácida gástrica basal de $8,5 \pm 0,5$ ml no controle para $11,7 \pm 0,3$ ml, $9,5 \pm 0,8$ ml e $10,9 \pm 0,4$ ml respectivamente. A atropina e a cimetidina conseguiram impedir os aumentos do volume do conteúdo gástrico secretado pelo betanecol e pela histamina fazendo com que os valores medidos de volume secretado em 4 horas de ligadura pilórica ficassem em $3,9 \pm 0,2$ ml e $4,8 \pm 0,3$ ml respectivamente. O EHI (400mg/kg) impediu o aumento do volume da secreção ácida gástrica estimulada pela pentagastrina ($5,9 \pm 0,4$ ml) e pela histamina ($8,4 \pm 0,6$ ml), mas não pelo betanecol ($10,7 \pm 0,6$ ml).

O betanecol, a pentagastrina e a histamina aumentaram a acidez da secreção gástrica basal de $0,06 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/ml no controle para $0,08 \pm 0,003$, $0,07 \pm 0,005$ e $0,10 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/ml, respectivamente. A atropina e a cimetidina conseguiram impedir o aumento da acidez do conteúdo gástrico estimulado pelo betanecol e pela histamina fazendo com que os valores medidos da acidez secretada em 4 horas de ligadura pilórica fossem em $0,02 \pm 0,004$ e $0,04 \pm 0,007$ mEq[H⁺]/ml, respectivamente. O EHI (400mg/kg) foi efetivo em impedir o aumento da acidez da secreção gástrica estimulada pela pentagastrina ($0,05 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/ml) e pela histamina ($0,06 \pm 0,006$ mEq[H⁺]/ml) mas não pelo betanecol ($0,07 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/ml). Esses resultados podem se observados na figura 13.

a)



b)



c)

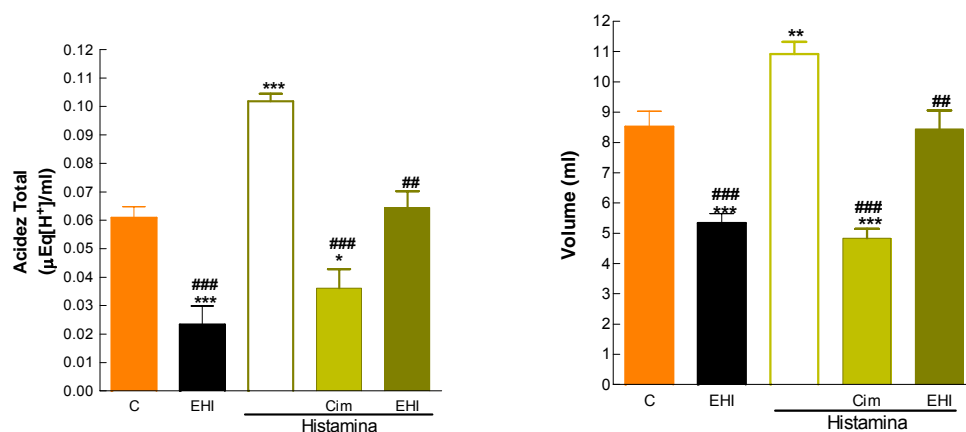


Figura 13: Efeitos do EHI (400 mg/kg, i.d.), atropina (Atr, 1mg/kg s.c) e cimetidina (Cim, 60mg/kg s.c) sobre a secreção ácida e volume gástrico estimulado em ratos com pentagastrina (400μg/kg s.c), betanecol (2,5mg/kg s.c) e histamina (20mg/kg s.c). As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 6 a 9 animais e representam: a) acidez e volume estimulados com betanecol; b) acidez e volume estimulados com pentagastrina e c) acidez e volume estimulados com histamina, após 4 horas da ligadura do piloro. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao controle; ## $p < 0,01$ #### $p < 0,001$ em relação ao estímulo secretagogo de seu grupo.

4.3.3 Efeito do EHI sobre a atividade da bomba $H^+/K^+/ATPase$ *in vitro*

O EHI nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu g/ml$ inibiu a atividade da bomba de prótons *in vitro* em $20\pm 1\%$, $45\pm 2\%$ e $56\pm 2\%$, respectivamente, e essa inibição ocorreu de maneira dependente da concentração, sendo que as concentrações de 10 e 1000 $\mu g/ml$ foram diferentes da concentração de 100 $\mu g/ml$. Enquanto que a inibição da bomba pelo omeprazol nas concentrações de 173 $\mu g/ml$ (0,5mM) e 345 $\mu g/ml$ (1,0 mM) foram de $49\pm 1\%$ e $95\pm 0,1\%$, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a dose de 100 $\mu g/ml$ de EHI e 173 $\mu g/ml$ de omeprazol. Esses resultados podem ser observados na figura 14.

Nenhuma das concentrações (10, 100 e 1000 $\mu g/ml$) das frações F45 e F55 testadas apresentaram efeito inibidor da bomba de prótons, e somente a maior concentração da F33 (1000 $\mu g/ml$) apresentou efeito inibidor significativo da bomba de prótons, que foi de 35% de inibição (dados não mostrados).

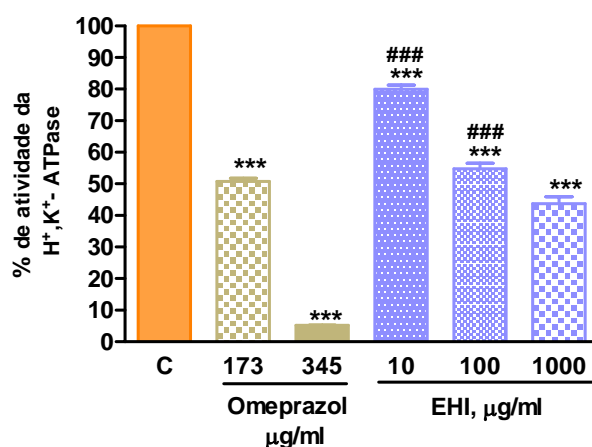


Figura 14: Efeito do omeprazol e do EHI sobre a % de atividade da $H^+/K^+/ATPase$ *in vitro*. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão da média da % de atividade da $H^+/K^+/ATPase$. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle.

*** $p < 0,001$ em relação ao controle; ### $p < 0,001$ em relação a concentração de 100 $\mu g/ml$ de EHI.

4.4 Avaliação da Motilidade Gastrointestinal

4.4.1 Efeito do EHI sobre o Trânsito intestinal em camundongos

A porcentagem da distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado de camundongos foi de $49,3 \pm 5,8$, $56,9 \pm 4,7$ e $64,4 \pm 5,8\%$; após tratamento prévio com EHI nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg respectivamente. Esses resultados não foram significativamente diferentes do grupo de animais que recebeu apenas água (controle) onde o marcador percorreu $53,2 \pm 5,4\%$ do comprimento total do intestino. O grupo de animais que recebeu tratamento com atropina apresentou $21,5 \pm 3,8\%$ de trânsito intestinal e os animais que receberam neostigmina apresentaram uma distancia percorrida pelo marcador no intestino delgado de $69,6 \pm 1,2\%$. Esses resultados podem ser observados na Figura 15.

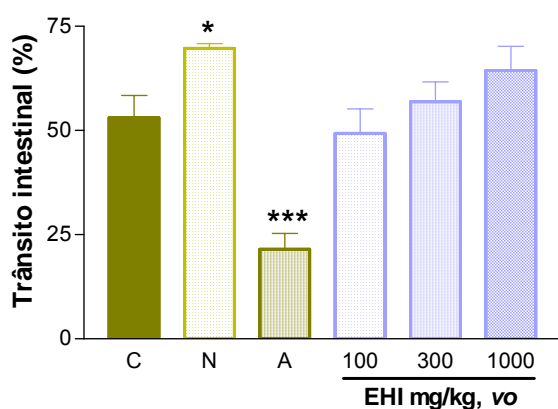


Figura 15: Efeitos do EHI, da atropina (A) e da neostigmina (N) sobre o trânsito intestinal em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 5 a 7 animais e correspondem as porcentagens da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado após 1 hora do tratamento. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle.

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.4.2 Efeitos do EHI sobre o Esvaziamento gástrico de semi-sólidos em camundongos

O esvaziamento gástrico determinado após a administração da metoclopramida foi de $90,5 \pm 1,5\%$. Este efeito foi superior ao valor de esvaziamento gástrico obtido quando os animais receberam apenas água (controle), que foi de $76,8 \pm 2,1\%$. Os animais tratados com atropina apresentaram esvaziamento gástrico reduzido para $46,1 \pm 3,7\%$. (40% menor que no grupo controle). O EHI administrado nas doses de 100, 300 e 1000mg/kg não alterou a taxa de esvaziamento gástrico em camundongos. Esses dados podem ser observados na Figura 16.

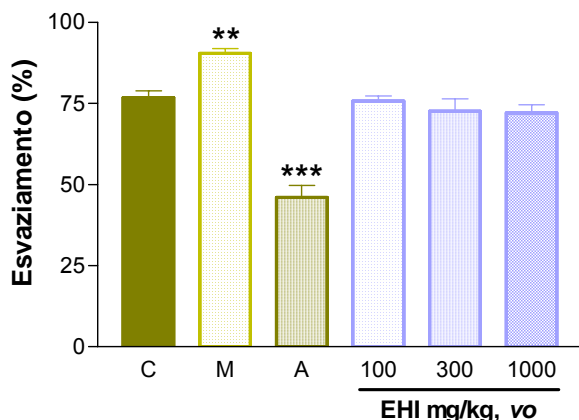


Figura 16: Efeitos do EHI, da atropina (A) e da metoclopramida (M) sobre o esvaziamento gástrico. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de 6 a 7 animais e correspondem as porcentagens de esvaziamento gástrico induzida pelos tratamentos. A comparação entre os grupos foi feita através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. C= controle.

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

5 DISCUSSÃO

Tabebuia avellanedae Lorentz ex Griseb é uma árvore da família Bignoniaceae comumente conhecida como ipê-roxo ou pau d'arco, sua casca é utilizada popularmente, mesmo sem comprovações científicas, como analgésico, antiinflamatório, antineoplásico, diurético e em disfunções do aparelho digestivo (MIRANDA et al, 2001).

Como o ipê-roxo é amplamente utilizado e comercializado e apresenta grande interesse sócio/econômico, procurou-se contribuir através da realização de estudos para avaliar sua ação sobre o trato gastrointestinal, mais especificamente, sua ação protetora gástrica.

Neste trabalho foi realizado um estudo inicial com o extrato bruto hidroalcoólico das cascas do ipê-roxo (EHI) e algumas frações deste extrato, procurando esclarecer a presença do efeito protetor gástrico e os possíveis mecanismos de ação envolvidos neste efeito.

Para avaliar a capacidade do EHI em proteger a mucosa gástrica foram utilizados os modelos de lesão aguda induzidos por etanol e ibuprofeno e o modelo de lesão crônica induzida por ácido acético.

Existem evidências indicando que o consumo excessivo de álcool tem um importante papel na etiologia da úlcera péptica em humanos (STERMER, 2002). Apesar destas lesões produzidas pelo agente necrozante em roedores não representarem integralmente as características da úlcera que se desenvolve em humanos (pois essas lesões nos roedores são superficiais e temporalmente agudas), esse modelo tem validade preditiva para a pesquisa de novas drogas potencialmente efetivas para o uso clínico.

Testou-se o extrato bruto hidroalcoólico das cascas do ipê-roxo (EHI) por via oral neste modelo experimental, e observou-se que o extrato bruto foi capaz de proteger a mucosa gástrica dos ratos contra as lesões induzidas pelo etanol (figura 4), sugerindo uma ação citoprotetora eficiente dos princípios ativos presentes neste extrato. Como o aumento da dose administrada aumentou o efeito protetor gástrico do extrato, sugeriu-se que este efeito é dependente da dose.

Sabe-se que o desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, enzimas antioxidantes, prostaglandinas e outros) e os fatores agressores (ácido clorídrico, pepsina, AINE, etanol e outros) causam lesões gástricas. Quando a barreira de muco é afetada pela administração do etanol, torna o epitélio gástrico mais sensível ao ataque do ácido produzido pelo estômago (WALLACE, 2001 b), e como consequência leva a formação das úlceras gástricas nos animais. Por isto, foi quantificado o muco gástrico, para esclarecer se essa era uma das vias pela qual o extrato do ipê-roxo estava exercendo sua ação protetora gástrica. A administração do EHI v.o. foi capaz de preservar a camada de muco (figura 5) contra a agressão promovida pelo etanol, sugerindo que a ação protetora gástrica do ipê-roxo pode estar ocorrendo pela manutenção do muco gástrico.

Para descartar a hipótese de que o EHI estivesse atuando apenas como uma barreira física, exercendo, portanto uma ação mecânica formando uma película de extrato sobre a mucosa e impedindo que etanol removesse a camada de muco, foi administrado o EHI pela via intraperitoneal. A administração por esta via exige a absorção dos princípios ativos do extrato. Foi observado que a administração do EHI (i.p.) protegeu a mucosa gástrica contra o etanol (figura 6), também de maneira dependente da dose como o EHI v.o., e produziu aumento da barreira de muco gástrico (figura 7). Assim pode se sugerir que o efeito protetor gástrico do EHI pode ser devido a manutenção do muco gástrico. Como a DE50 do efeito protetor gástrico exercido pelo EHI quando administrado pela via oral foi menor do que quando administrado pela via intraperitoneal não podemos descartar a presença de uma ação protetora como barreira física (mecânica). Também pode ter ocorrido a menor absorção de princípios ativos deste extrato envolvidos nesta atividade quando administrado pela via parenteral em comparação com a via oral.

Como foi verificado no modelo de lesão por etanol, com animais tratados com EHI via i.p., que o extrato possuía ação sistêmica, e não só mecânica todos os próximos modelos experimentais *in vivo* foram conduzidos com tratamento v.o.

Outro fator que leva ao desequilíbrio dos fatores protetores da mucosa gástrica são os AINE. Sua ação antiinflamatória através da inibição da enzima COX (ciclooxigenase) e, conseqüente, redução da produção de PG, é responsável

pelas lesões gástricas, haja visto que as prostaglandinas são essenciais para a manutenção da integridade da mucosa gástrica envolvendo mais de um mecanismo de ação. Os AINE provocam danos a mucosa gástrica por mais de uma via, como por exemplo, ao inibirem COX-1 reduzem o fluxo sanguíneo, ao inibirem COX-2 aumentam a aderência de leucócitos no endotélio vascular e por uma ação tópica direta causam irritação da mucosa (revisado por WALLACE, 2006).

O envolvimento das prostaglandinas na proteção da mucosa gástrica exercida pelo EHI foi verificado através do modelo de lesão induzida por ibuprofeno (AINE). Os ratos que foram tratados com EHI antes da indução das lesões com ibuprofeno apresentaram menor área lesada na mucosa gástrica, em comparação ao grupo não tratado (figura 8), assim como os animais que receberam prostaglandina (cloprostenol).

Como o EHI foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra os danos induzidos pelo etanol através do aumento do muco gástrico e proteger contra a formação de lesões causadas pelo ibuprofeno, que diminui a produção de PG, e sabendo-se que as PG são responsáveis pelo aumento do muco gástrico, assim, é possível que os compostos presentes no EHI de alguma forma estejam atuando aumentando a produção de PG no estômago dos ratos.

Foi avaliada também a capacidade do extrato em aumentar a resolução das lesões gástricas induzidas pela administração do ácido acético, pois, esse modelo de úlcera gástrica traz como vantagem a sua semelhança com a úlcera humana, em termos de características fisiopatológicas e de tratamento. (Revisado por OKABE & AMAGASE 2005).

Nesse modelo, o extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo foi efetivo e reduziu a lesão induzida pelo ácido acético. Além disto, a capacidade de cicatrização da úlcera promovida pelo extrato foi maior com o aumento da dose administrada, sugerindo também neste modelo, uma ação específica deste extrato.

Na cicatrização da úlcera gástrica crônica vários fatores podem estar envolvidos. Dentre estes fatores podem ser enumerados: a estimulação da expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) pelos nervos sensíveis a

capsaicina, o aumento na produção de muco e prostaglandinas, a inibição da infiltração de neutrófilos e a peroxidação lipídica no tecido lesado (RODRIGUEZ et al., 2003).

Os radicais livres têm um papel de destaque no desenvolvimento da úlcera crônica (HAMAISHI et al., 2006), e os neutrófilos são descritos como umas das maiores fontes geradoras desses radicais livres. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é um indicativo da presença de polimorfonucleares, assim, foi verificada a capacidade do EHI em reverter o aumento da atividade da MPO nos animais com úlcera gástrica crônica. Após o tratamento com o extrato do ipê-roxo a atividade da MPO foi reduzida em cerca de 30%, assim, sugeriu-se que o EHI seja capaz de reduzir a presença de polimorfonucleares na área lesada.

Estudos demonstraram o envolvimento da via da MAPK e EGF na manutenção e reparo da mucosa gástrica (SEKIGUCHI et al, 2007, BASUROY et al, 2006) e evidências indicam que o EGF previne o rompimento do epitélio gástrico induzido pelo estresse oxidativo (RAO et al, 1999). O EGF ligando-se no seu receptor leva a ativação da via da MAPK, que atuando no núcleo celular, leva a ativação de fatores de transcrição (c-fos, c-myc e c-jun), esses fatores iniciam a transcrição de genes envolvidos na diferenciação e proliferação celular, adicionalmente, esses fatores induzem a transcrição da enzima COX-2, responsável pela produção de PG (GUPTA & DUBOIS, 2000), assim, essa via fornece os efeitos protetores gástricos das PG e do EGF.

Tarik & Al Moutaery 2005, demonstraram a ação protetora gástrica da menadiona (composto presente nas cascas do ipê-roxo), e sabe-se que a menadiona é capaz de ativar a via da MAPK (YUE et al, 2001). Analisando-se os dados obtidos até o momento, é possível que compostos presentes no EHI (como a menadiona) poderiam estar ativando a via da MAPK e sendo responsáveis pela ação protetora gástrica do extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo. No modelo de lesão gástrica induzida por etanol, o EHI ao ativar MAPK leva ao aumento de PG e, conseqüentemente, de muco gástrico. Essa teoria pode ser reforçada pelo efeito protetor contra lesões induzidas por ibuprofeno (AINE), o EHI administrado previamente aos animais pode estar envolvido na produção/manutenção de PG e,

assim, levam ao aumento de fatores protetores. Adicionalmente, a ativação da via MAPK/EGF aumenta a proliferação celular e reparo da mucosa gástrica, e o presente estudo demonstrou que o EHI foi capaz de aumentar a cicatrização gástrica no modelo de úlcera crônica.

Outro fator importante que poderia estar envolvido na ação protetora gástrica do extrato do ipê-roxo seria a presença, neste extrato, de compostos com atividade seqüestradores de radicais livres. Para esclarecer, realizou-se a determinação do seqüestro do radical livre DPPH. A avaliação da taxa de seqüestro do radical livre DPPH *in vitro*, pode ser um indicativo que o EHI possa estar interagindo com radicais livres produzidos no estômago durante a formação da lesão gástrica induzidas pelo etanol, ibuprofeno ou ácido acético. O extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI) e suas frações (F33, F45 e F55) foram capazes de diminuir a concentração de DPPH livre (figura 11), sugerindo uma ação direta dos compostos do EHI atuando como seqüestradores de radicais.

Depois de observado que o extrato do ipê-roxo é capaz de proteger a mucosa gástrica e que nesta ação podem estar envolvidos a preservação do muco, ativação da via MAPK, aumento da produção de PG e a presença de princípios ativos com atividade antioxidante, passou-se a estudar se este extrato estaria interferindo de alguma forma com a secreção ácida gástrica, já que este efeito (redução da secreção ácida) poderia também ser responsável pela proteção gástrica, visto que os protetores gástricos mais prescritos na terapia da úlcera/gastrite são os bloqueadores de receptores H₂ e inibidores de bomba de prótons, e ambos atuam diminuindo a acidez gástrica.

A secreção ácida gástrica é finamente regulada por vias interdependentes que incluem o sistema nervoso central, o sistema nervoso entérico e uma intrincada rede de células neuroendócrinas e imunes, que atuam na modulação parácrina e hormonal (Revisado por Schubert, 2004). A interação da histamina, gastrina e acetilcolina com seus receptores nas células parietais são os principais responsáveis pela ativação da bomba de prótons, enzima secretadora de H⁺ que confere o pH ácido ao suco gástrico. Assim, uma ação inibidora do extrato bruto

hidroalcoólico em qualquer nível da estimulação da secreção ácida, poderia estar levando a proteção gástrica por diminuir os fatores agressores da mucosa.

Através da metodologia de ligadura pilórica, foi possível analisar as ações do extrato bruto do ipê-roxo sobre a atividade secretória basal e a estimulada (por secretagogos) na célula parietal. O tratamento dos animais com o extrato do ipê-roxo levou a uma diminuição do volume do conteúdo gástrico, mas de forma independente da dose, ou seja, não houve diferença significativa entre a menor e a maior dose (30mg/kg e 1000mg/kg). Enquanto que a acidez total da secreção ácida gástrica foi reduzida (figura 12) em maior intensidade quanto maior foi a dose administrada, sugerindo que o extrato do ipê-roxo inibe especificamente a secreção de ácido sem interferir com outras secreções gástricas, o que leva a uma diminuição da acidez de forma gradual que não é acompanhada pela diminuição do volume secretado.

Visto que o extrato do ipê-roxo estava inibindo a acidez da secreção gástrica, tornava-se importante tentar esclarecer quais os receptores/mediadores da célula parietal em que estariam atuando os princípios ativos presentes no extrato do ipê-roxo. Para isto, utilizou-se a mesma técnica de determinação da secreção ácida gástrica, em ratos com piloro ligado por quatro horas, porém na presença de agonistas (secretagogos) e antagonistas dos receptores de histamina (H2), de gastrina (CCK2) e de acetilcolina (M3).

O pré-tratamento dos ratos com EHI foi capaz de inibir o aumento do volume do conteúdo gástrico e da acidez total da secreção ácida gástrica quando os animais foram tratados com agonistas dos receptores CCK2 (pentagastrina) e dos receptores H2 (histamina), mas não houve diminuição no volume e da acidez da secreção ácida gástrica quando realizada a administração de agonistas de receptores M3 (betanecol). Esses resultados (figura 13) indicam que a diminuição da acidez da secreção nos animais tratados com EHI seria através de interações de compostos presentes no extrato do ipê-roxo com a ligação/sinalização mediada pela histamina em receptores H2 e de gastrina em receptores CCK2.

Como o extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo apresentou ação inibidora sobre a secreção ácida gástrica, interferindo na secreção induzida pela

estimulação dos receptores H2 com histamina e na secreção induzida pela estimulação dos receptores CCK2 com pentagastrina, foi analisado se o EHI também poderia estar diminuindo a acidez da secreção por atuar na etapa final da produção do ácido gástrico, ou seja, sobre a atividade da enzima $H^+/K^+/ATPase$, a bomba de prótons. A bomba $H^+/K^+/ATPase$ é a responsável pela secreção de íons H^+ que produz o ambiente ácido do estômago, assim, sua inibição acarreta a diminuição da acidez estomacal.

O EHI apresentou efeito inibidor da bomba de prótons *in vitro* (figura 14), sendo que a concentração de 100 $\mu g/ml$ inibiu $45 \pm 2\%$ da atividade da bomba de prótons, e essa atividade não diferiu significativamente da inibição da bomba produzida pela concentração de 173 $\mu g/ml$ de omeprazol ($49 \pm 1\%$). Sugerindo que essa via de inibição da secreção ácida gástrica é outro local de ação dos compostos presentes no extrato do ipê-roxo. Mas não pode ser atribuída somente a inibição da bomba de prótons o efeito de diminuição da acidez gástrica pelo extrato, sendo que o EHI foi incapaz de reverter o aumento da acidez induzido pelo betanecol, mas reverteu a acidez induzida pela pentagastrina e pela histamina, indicando assim, que os efeitos da redução da secreção ácida gástrica do EHI são complementares.

Outro local em que o EHI poderia estar atuando para promover a proteção da mucosa gástrica seria através do aumento da motilidade gastrointestinal, assim, o esvaziamento gástrico aumentado diminuiria a quantidade de ácido presente no estômago e reduziria o efeito agressor do ácido. A via colinérgica que inerva a camada de músculo circular do TGI, atuando nos receptores M1 e M3, é a principal responsável pela motilidade gastrointestinal (Revisado por HANSEN, 2003), e a alteração dessa função está relacionada com distúrbios gastroesofágicos.

A não participação do sistema colinérgico no mecanismo de ação do extrato do ipê-roxo, observada pela incapacidade do EHI em impedir o aumento de secreção ácida gástrica induzida pela estimulação dos receptores M3 da célula parietal com betanecol, foi confirmada pela ausência de efeito do extrato sobre a motilidade gastrintestinal, observada nos modelos de determinação do trânsito

intestinal (figura 15) e do esvaziamento gástrico (figura 16) realizado em camundongos.

Analisando-se os resultados obtidos até aqui foi visto que o EHI apresentou efeito protetor gástrico quando foi induzida úlcera aguda por etanol e ibuprofeno e efeito na resolução da úlcera pré-formada, quando foi induzida úlcera crônica com ácido acético. O EHI parece estar protegendo a mucosa gástrica por mais de uma via, tanto aumentando fatores protetores como diminuindo fatores agressores. Algumas dessas ações do extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo são: preservação do muco; seqüestro de radicais livres; diminuição da atividade da MPO; redução da acidez da secreção ácida gástrica das células parietais por interação com a ligação aos receptores H2 e CCK2 e/ou suas vias de sinalização intracelular e inibição da atividade da bomba de prótons (H^+/K^+ ATPase).

As drogas mais utilizadas atualmente para o tratamento das dispepsias funcionais (inibidores de bomba ou antagonistas H2) apresentam um mecanismo de ação único ou majoritário, que leva a redução da secreção ácida gástrica. O organismo desencadeia mecanismos compensatórios para reverter essa redução da secreção ácida, utilizando para isto, outras vias que não foram inibidas e, assim, gerando hipergastrinemia, o que é indesejável no tratamento da úlcera péptica (JAIN et al, 2006). Como foi observado nesse estudo, o extrato bruto hidroalcoólico do ipê-roxo apresenta mais de um mecanismo de ação, no seu efeito protetor gástrico, o que pode reduzir a possibilidade do organismo de gerar uma resposta compensatória à diminuição da acidez gástrica.

A importância da validação da atividade gastroprotetora do ipê-roxo é complementada pela existência de estudos que demonstraram que o extrato da casca de *Tabebuia avellanae* apresentou potente atividade *in vitro* contra o *Helicobacter pylori* (PARK et al, 2006). Cerca de 80% da população de países em desenvolvimento apresentam infecção gástrica por *H. pylori*, essa infecção pode contribuir para o desenvolvimento de doenças como gastrite, úlcera e câncer de estômago (BLASER & BERG, 2001). O atual tratamento das úlceras, nas quais existe a presença da bactéria, é realizado com a administração de antibióticos e inibidores de bomba em conjunto, que tornam elevado o custo da terapia. Esse

alto custo da terapia é um empecilho ao tratamento, principalmente em países em desenvolvimento, levando a falha terapêutica e reincidência da úlcera pela não erradicação da bactéria (BLASER & BERG, 2001).

Desse modo, as ações protetoras gástricas produzidas pelo extrato bruto hidroalcoólico das cascas do ipê-roxo envolvendo mais de um mecanismo de ação e a existência de estudos que indicam sua ação contra o *H. pylori*, tornam a *Tabebuia avellanedae* uma fonte em potencial para novos estudos que comprovem sua utilização como uma forma alternativa para o tratamento de problemas gástricos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que:

- O extrato hidroalcoólico do ipê-roxo (EHI) administrado pela via oral foi capaz de proteger a mucosa gástrica de ratos contra lesões induzidas pelo etanol 80% e pelo ibuprofeno;
- O extrato hidroalcoólico do ipê-roxo administrado pela via intraperitoneal protegeu a mucosa gástrica de ratos quando as lesões foram induzidas pelo etanol 80% e aumentou o muco gástrico;
- O EHI acelerou a resolução da úlcera induzida pelo ácido acético na mucosa gástrica de ratos;
- As frações F33, F45 e F55 do EHI e o EHI apresentaram atividade seqüestradora do radical livre DPPH;
- O EHI foi capaz de diminuir o volume e a acidez da secreção ácida gástrica em ratos;
- O EHI foi capaz de impedir o aumento da acidez e do volume da secreção ácida gástrica induzidos pela histamina e pela pentagastrina;
- O EHI inibiu a atividade da enzima $H^+/K^+/ATPase$ *in vitro*;
- O EHI não alterou a motilidade gastrointestinal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICAN, I.; KUBES, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **The American Journal of Physiology**. v.270, p.225-237, 1996

ALLEN A, GARNER A. Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. **Gut**.; v.21, p.249-262, 1980.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DuBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.61, n.3-4, p.105-124, 2000.

BASUROY, S.; SETH, A.; ELIAS, B.; P. NAREN, A.; RAO, R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**. v. 393, p. 69-77, 2006.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**. v.13, p.584-590, 2006.

BECKMAN, J.; KOPPENOL, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **The American Journal of Physiology**. v.271, p.1424-1437, 1996.

BIRDANE, F. M.; CEMEK, M.; BIRDANE, Y. O.; GÜLÇİN, I.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E. Beneficial effects of Foeniculum vulgare on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **World Journal of Gastroenterology**. v.13, p.607-611, 2007.

BLASER, M. J. Helicobacter pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **The Journal of Infectious Diseases**. v.161, p. 626-633, 1990.

BLASER, M. J. & BERG, D. E. Helicobacter pylorigenetic diversity and risk of human disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 107, n. 7, p. 767-773, 2001.

BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, P. C. H.; KONTUREK, S. J.; MITIS-MUSIOL, M.; DUDA, A.; BIELAŃSKI, W.; HAHN, E. G. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. **Medical Science Monitor**. v.7, p.592-599, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology** v.100, p.131–134, 2005.

CHEY, W. Y.; CHANG, C. H.; PAN, H. J.; CHANG, C.; KIM, B. M.; PARK, I. S.; CHANG, T. M. Evidence on the presence of secretin cells in the gastric antral and oxyntic mucosa. **Regulatory Peptides**. v.111, p.183-190, 2003.

CLARIA, J. & SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously unrecognized bioactive eicosanoids in human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.92, p.9475-9479, 1995.

DEMBINSK, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; BRZOZOWSKI, T.; DEMBINSK, M.; KONTUREK, S. J.; PAWLIK, W. W. Role of capsaicin-sensitive nerves and histamine H1, H2, and H3 receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcers in rats. **European Journal of Pharmacology**. v.508, p. 211-221, 2005.

DING, M.; KINOSHITA, Y.; KISHI, K.; NAKATA, H.; HASSAN, S.; KAWANAMI, C.; SUGIMOTO, Y.; KATSUYAMA, M.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A.; CHIBA, T. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**. v.53 (3), p.199-216, 1997.

EASTWOOD, G. L. Is Smoking Still Important in the Pathogenesis of Peptic Ulcer Disease?. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v.25, Suppl.1:S1-S7, 1997

EL-OMAR, E. M.; OIEN, K.; MURRAY, L. S.; EL-NUJUMI, A.; WIRZ, A.; GILLEN, D.; WILLIAMS, C.; FULLARTON, G.; MCCOLL, K. E. L. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: Critical role of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**. v. 118, p. 22-30, 2000.

FIORUCCI, S.; DE LIMA, O. M. JR.; MENCARELLI, A.; PALAZZETTI, B.; DISTRUTTI, E.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; MA, L.; ROMANO, M.; MORELLI, A.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase-2-derived lipoxin A4 increases gastric resistance to aspirin-induced damage. **Gastroenterology**. v.123, p.1598-1606, 2002.

FLOWER, R. J. Case history: the development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.2, p.179-191, 2003.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol . chemistry, pharmacology and assay methods. **Revista Brasileira de Farmacologia**., v. 84, p. 9-16, 2003.

FUKUDA, K.; TSUKADA, H.; OYA, M.; ONOMURA, M.; KODAMA, M.; NAKAMURA, H.; HOSOKAWA, M.; SEINO, Y. Adrenomedullin promotes epithelial restitution of rat and human gastric mucosa in vitro. **Peptides**, v.20, p.127–32, 1999

GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.43–49, 2005.

GOEL, R. K.; PATHAK, N. K. R.; BISWAS, M.; PANDEY, V. B.; SANYAL, A. K. Effect of Lapachol, a naphthoquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 138-140, 1987.

GOMEZ, G.; ENGLANDER, E. W.; GREELEY, G. H. JR. Nutrient inhibition of ghrelin secretion in the fasted rat. **Regulatory Peptides**. v.117, p.33-36, 2004.

GUIMARÃES, M.M.; RIECK, L.; SILVA-SANTOS, J.E.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M.C.A. Pesquisas Realizadas com Plantas Medicinais no Estado do Paraná no período de 1992 a 2002. In: CORREIA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1. ed. Curitiba: EMATER, 2004, p. 167-69.

GUPTA, R. A. & DUBOIS, R. N. Combination therapies involving inhibitors of the epidermal growth factor and cyclooxygenase signaling prevent colorectal adenomas in mice. This synergistic effect may be due to the convergence of these two signaling pathways. **Nature Medicine**. v. 6, n. 9, p. 1024-1028, 2000.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**. v.9, p.1-32. 1990.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer Effect of Tea Catechin in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.29, p.2206-2213, 2006

HANSEN, M.B. Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. **Physiological research.**, v. 52, p. 1-30, 2003.

HIRSCH, A. B.; MCCUEN, R. W.; ARIMURA, A.; SCHUBERT, M. L. Adrenomedullin stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in the fundus of the stomach. **Regulatory Peptides.** v.110, p.189-195, 2003.

HOGABOAM, C. M.; BISSONNETTE, E. V.; CHIN, B. C.; BEFUS, A. D.; WALLACE, J. L. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. **Gastroenterology** v.104, p.122-129, 1993

ISHIHARA, S., TSUCHIYA, S., HORIE, S., MURAYAMA, T., WATANABE, K. Stimulatory effects of centrally injected n-opioid receptor agonists on gastric acid secretion in urethane-anesthetized rats. **European Journal Pharmacology.** v. 418, p.187-194, 2001.

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, A. P.; JAGTAP, J. R.; BHOSALEC, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 15, p. 1181–1205, 2007.

KAUNITZ, J. D. & AKIBA, Y. Gastroduodenal mucosal defense: role of endogenous mediators. **Current Opinion in Gastroenterology.** v.20, p.526–532, 2004.

KAWABATA, A. Gastrointestinal functions of proteinase-activated receptors. **Life Science.** v.74, p.247-254, 2003.

KAWASHIMA, K.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K.; MORIYAMA, N.; KAZUMORI, H.; SUETSUGU, H.; SATO, H.; FUKUDA, R.; ADACHI, K.; SHIBATA, M.;

ONODERA, S.; CHIBA, T.; KINOSHITA, Y. Localization of calcitonin gene-related peptide receptors in rat gastric mucosa. **Peptides**. v.23, p.955–966, 2002.

KONTUREK, P. C. H.; DUDA, A.; BRZOZOWSKI, T. KONTUREK, S. J.; KWIECIEN, S.; DROZDOWICZ, D.; PAJDO, R.; MEIXNER, H.; HAHN, E. G. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia – reperfusion gastric injury. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v.35, p.452-463, 2000.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.39-50, 2002 a.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK S. J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.761-73, 2002 b.

LEE, A.; DIXON, M.F.; DANON, S.J.; KUIPERS, E.; MEGRAUD, F.; LARWSSON M.; MELLGÅRD, B. Local acid production and Helicobacter pylori: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v.7, p. 461-5, 1995.

LEE, J.; CHEONG, J.; PARK, Y. M.; CHOI, Y. H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research**. v.51, p.553–560, 2005.

LEVENSTEIN, S. Stress and peptic ulcer: life beyond helicobacter. **BMJ (Clinical research ed.)**. v.316, p.538-541, 1998.

LIPOF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R. A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World Journal of Gastroenterology**. v.20, p.3248-3252, 2006

MAHADEVA, S.; GOH, K.; Epidemiology of functional dyspepsia: A global perspective. **World Journal of Gastroenterology**. v.17, p.2661-2666, 2006

MINOWA, S.; TSUCHIYA, S.; SOMEYA, A.; HORIE, S.; MURAYAMA, T. Role of neuropeptide receptor systems in vanilloid VR1 receptor-mediated gastric acid secretion in rat brain. **European Journal of Pharmacology**. v.486, p.317-324, 2004.

MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A. N.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**., 2001.

MONDAL, M. S.; DATE, Y.; MURAKAMI, N.; TOSHINAI, K.; SHIMBARA, T.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Neuromedin U acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via CRH system. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**. v.284, p.963-969, 2003

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. v.66, p1002-1037, 2003.

OKABE, S. & AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models – The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biol. Pharm. Bull**. v.28, p.1321-1341, 2005.

PARK, B.; LEE, H.; LEE, S.; PIAO, X.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHNA, Y.; KIM, J. H. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.105, p.255–262, 2006.

PARSONNET, J.; HANSEN, S.; RODRIGUEZ, L. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **The New England Journal of Medicine**. v.330, p. 1267-1271, 1994.

POMMIER, B.; MARIE-CLAIRE, C.; DA NASCIMENTO, S.; WANG, H. L.; ROQUES, B. P.; NOBLE, F. Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis. **Journal of Neurochemistry**. v.85, p.454-461 2003.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional Medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v.76, p.93–98, 2001.

PRINZ, C.; ZANNER, R.; GRATZL, M. Physiology of gastric Enterochromaffin-like cells. **Annual Review of Physiology**. v.65, p.371–82, 2003.

RAO, R.; BAKER, R. D.; BAKER, S. S. Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor. **Biochemical Pharmacology**. v. 57, p. 685-695, 1999.

REN, J.; YOUNG, R. L.; LASSITER, D. C.; HARTY, R. F. Calcitonin generelated peptide mediates capsaicin-induced neuroendocrine responses in rat antrum. **Gastroenterology**. v.104, p. 485-491, 1993.

REPETTO, M. G. & LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.35, p.523-534, 2002.

RODRIGUEZ, J.A.; ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 291-294, 2003.

SEKIGUCHI, F.; SAITO, S.; TAKAOKA, K.; HAYASHI, H.; NAGATAKI, M.; NAGASAWA, K.; NISHIKAWA, H.; MATSUI, H.; KAWABATA, A. Mechanisms for prostaglandin E2 formation caused by proteinase-activated receptor-1 activation in rat gastric mucosal epithelial cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 73, n. 1, p. 103-114, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento** (Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. 3ed.) Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC. Capítulo 15. 301-332, 2001.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.20, p.519-525, 2004.

SHAH, V.; KAMATH, P.; DE GROEN, P. Physiology of the splanchnic circulation. In: **Theory and practice of vascular diseases** (Topol E, Lanzer F, eds). p.1688-1694, Germany: Springer Verlag, 2002

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterology**. v.126, p.903-913, 2004

SON, D.; LIM, Y.; PARK, Y. H.; CHANG, S.; YUN, Y.; HONG, J.; TAKEOKA G. R.; LEE, K.; LEE, S.; KIM, M.; KIM, J.; PARK, B. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and

ERK1/2 MAPK activation. **Journal of Ethnopharmacology**. v.108, p.148–151, 2006.

SORBYE H.; SVANES, K. The role of blood flow in gastric mucosal defence, damage and healing. **Digestive Diseases**. v.5, p.305-17, 1994

STAMLER, J.; LAMAS, S.; FANG, F. Nitrosylation: the prototypic redoxbased signaling mechanism. **Cell**. v.106, p.675–683, 2001

STERMER, E. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. **The Israel Medical Association Journal**. v. 4, n. 3, p. 200-2, 2002.

TAKEUCHI, K.; KATO, S.; OGAWA, Y.; KANATSU, K.; UMEDA, M. Role of endogenous prostacyclin in gastric ulcerogenic and healing responses – a study using IP-receptor knockout mice. **Journal of Physiology**. v.95, p.75-80, 2001.

TAKEUCHI, K.; KATO, S.; TANAKA, A. Gastrointestinal protective action of prostaglandin E2 and EP receptor subtypes. In: **Frontiers of Gastrointestinal Research** (Edited by Cho CH, Wang JY). v.25, p.227-242, Basel, Karger, 2002.

TARIQ, M.; AL MOUTAERY, A. Menadione protects gastric mucosa against ethanol-induced ulcers. **The Experimental and Toxicological Pathology**. v. 56, n. 6, p. 393-399, 2005.

TAYLOR, L. **The Healing Power of Rainforest Herbs**, 2005. <disponível em: <http://www.rain-tree.com/paudarco.htm>> acesso em 03/02/2006.

TEBBE, J. J.; MRONGA, S.; SCHÄFER, M. K. H.; RUTER, J.; KOBELT, P.; MONNIKES, H. Stimulation of neurons in rat ARC inhibits gastric acid secretion via

hypothalamic CRF1/2- and NPY-Y1 receptors. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.1075-1083, 2003.

The International Plant Names Index (2004). <disponível em: <http://www.ipni.org>> Acessado em: 10/01/2007.

TSUCHIYA, S., HORIE, S., YANO, S., WATANABE, K., Stimulatory effects of centrally injected kainate and N-methyl-D-aspartate on gastric acid secretion in anesthetized rats. **Brain Research**. v.914, p.115-122, 2001.

WALLACE J. L.; WHITTLE B. J. R. Role of mucus in the repair of gastric epithelial damage in the rat. Inhibition of epithelial recovery by mucolytic agents. **Gastroenterology**. v.91, p.603-611, 1986.

WALLACE, J. L. and GRANGER D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The FASEB Journal**. v.10, p.731-740, 1996.

WALLACE, J.L.; MCKNIGHT, W. ; REUTER, B. K. ; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology** v.119, p.706-714, 2000.

WALLACE, J. L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **The American Journal of Medicine**. v.110, p.19-23, 2001 a.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v.15, p.691-703, 2001 b.

WALLACE, J. L. and FIORUCCI, S. A magic bullet for mucosal protection...and aspirin is the trigger! **Trends in Pharmacological Sciences**. v.24, p.323-326, 2003.

WALLACE, J. L. COX-2: A Pivotal Enzyme in Mucosal Protection and Resolution of Inflammation. **The Scientific World Journal**. v. 6, p. 577-588, 2006.

WANG, H.; TOMIKAWA, M.; JONES, M. K.; SARFEH, I. J.; TARNAWSKI, A. S.; Ethanol injury triggers activation of adrenomedullin and its receptor genes in gastric mucosa. **Digestive Diseases and Sciences**. v.44, p.1390- 400, 1999.

WRIGHT, N. A. Role of mucosal cell renewal in mucosal protection in the gastrointestinal tract. In **Mechanisms of Mucosal Protection in the Upper Gastrointestinal Tract** (Allen, A., Flemstrom, C., Gamer, A., Silen, W., and Turnberg, L A., eds) p.15-20, Raven Press, New York, 1984

YUE, Y.; KRENZ, M.; COHEN, M. V.; DOWNEY, J. M.; CRITZ, S. D. Menadione mimics the infarct-limiting effect of preconditioning in isolated rat hearts. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**. v. 281, p. 590-595, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 24, p.147-152, 2001.

ZEVERING, Y.; JACOB, L.; MEYER, T. F. Naturally acquired human immune response against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. **Gut**. v. 45, p. 465-474, 1999.